



Analyse d'interactions moléculaires par RMN : Étude de la DHFR en présence d'osmolytes et structures de pseudopeptides antimicrobiens en environnement membranaire

Baptiste Legrand

► To cite this version:

Baptiste Legrand. Analyse d'interactions moléculaires par RMN : Étude de la DHFR en présence d'osmolytes et structures de pseudopeptides antimicrobiens en environnement membranaire. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Rennes I, 2009. Français. NNT : . tel-00453405

HAL Id: tel-00453405

<https://theses.hal.science/tel-00453405>

Submitted on 4 Feb 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie et Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie – Agronomie – Santé

présentée par

Baptiste LEGRAND

préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6026 ICM
Interactions Cellulaires et Moléculaires
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement (S.V.E)

Intitulé de la thèse :

**Analyse d'interactions moléculaires par RMN : Étude de la DHFR
en présence d'osmolytes et structures de pseudopeptides
antimicrobiens en environnement membranaire**

Thèse soutenue à Rennes le 4 Décembre 2009

devant le jury composé de :

Christine EBEL

Carine VAN HEIJENOORT

Michèle BAUDY FLOC'H

Olivier LEQUIN

Arnaud BONDON

DR CNRS, UMR 5075, Grenoble / *rapporteur*

CR CNRS, UPR 2301, Gif sur Yvette / *rapporteur*

DR CNRS, UMR 6226, Rennes 1 / *examineur*

PR, UMR 7613, Université de Paris 6 / *examineur*

DR CNRS, UMR 6026, Rennes 1 / *directeur de thèse*

Je dédie cette thèse à mon grand-père, Jean Legrand

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans l'équipe « Résonance Magnétique Nucléaire et Interactions Lipides-Protéines » de l'UMR CNRS 6026 de l'université de Rennes 1 et ont été financés par la Région Bretagne.

Je tiens tout d'abord à remercier Arnaud Bondon qui dirige l'équipe RMN-ILP pour avoir encadré cette thèse et pour la liberté dont j'ai bénéficié durant ces trois années de travail. J'ai ainsi pu jongler entre divers sujets, étendre ma culture scientifique tout en utilisant diverses techniques. J'ai beaucoup appris à ton contact tant au niveau professionnel qu'au niveau humain. Ton indéfectible soutien et la pertinence de tes conseils m'ont permis de mener à bien ce projet. Je ne serais jamais aussi précis sur les conflits du moyen-orient et je n'égalerai jamais ton humour décapant et parfois si raffiné, néanmoins je pense pouvoir faire jeu égal au squash.

Je remercie Christine Ebel et Carine Van Heijenoort d'avoir accepté de juger ces travaux, ainsi que Olivier Lequin et Michèle Baudy Floc'h pour leur rôle d'examineur. La discussion lors de la soutenance, particulièrement intéressante et enrichissante a fait germer de nouvelles idées.

Une partie de ce travail est le fruit d'une collaboration, mes remerciements vont à Mathieu, Michèle pour les nombreuses discussions scientifiques.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Armel Davenel pour avoir joué le rôle de tuteur et pour la pertinence des questions posées lors de nos différentes réunions.

Je remercie profondément les membres (et anciens membres) de l'équipe RMN-ILP qui ont contribué à l'ambiance du laboratoire et participé à divers degrés à ces travaux et sans qui ces divers projets ne seraient pas aussi aboutis : dans le désordre, Grégory Da Costa pour ces conseils et les nombreux sujets de discussion abordés, de la RMN à l'orientation des plages par rapport au soleil en passant par la stratégie à adopter face aux zergs; Liza Mouret, Sébastien Legardinier et Joe Sarkis qui ont partagé le même bureau à divers moments de ma thèse ; Liza qui m'a toujours soutenu et aiguillé dans mes périodes de doute, Sébastien un disciple de la kill' attitude et Joe la fashion victime; Muriel Collen qui m'a souvent épaulé dans mes expériences ; Elisabeth le Rumeur et Jean François Hubert qui m'ont beaucoup encouragé et qui m'ont fait profité de leurs connaissances ; Céline Raguenés-Nicol, Sandrine Pottier, Matthieu Simon, Soizic Chevance, Eduardo de Oliveira, Angélique Chéron.

Je tiens à remercier les stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours de ces trois années et leur souhaite bon vent : Julien, Emilie, Yoann (dommage que tu n'aies pas pu nous accompagner faire des manip à Beaulieu) et Didier, le spécialiste de la dilution en cascade, pour la bible qu'il nous a légué.

J'ai une pensée particulière pour Chantal qui a beaucoup donné de son temps, en plus de son travail, pour organiser la vie au laboratoire indispensable à la cohésion sur la plateforme PRISM : Les décorations et repas de Noël, les gâteaux « 3 chocolats »... Je te souhaite de bien profiter de ta retraite et merci encore pour l'organisation de mon pot de thèse.

Je suis particulièrement reconnaissant envers Marie Le Floc'h et les membres du laboratoire de physique pharmaceutique pour m'avoir permis de découvrir l'enseignement, ce fut une expérience agréable et très enrichissante.

Je remercie les membres (et anciens membres) du projet QUIMMI qui ont largement contribué à l'ambiance de la plateforme : PA, Eric, Hervé, Loan, Fanny, Agnès, Sylvain et Fabien.

Je n'oublierais pas les soirées et weekend, qui permettent de s'aérer l'esprit, en présence de : Mathieu (beubeu), Yann, Olivier, Benoît, Marie, Fabrice, Olivier, Julia, Nico, Valérie, Yves Marie, Fabien, Joe, Greg...

J'ai une pensée également pour les anciens du CBM et tout particulièrement Yann Vaï, Romy et Pauline, ainsi que les membres de l'équipe anciennement dirigées par Françoise Vovelle qui m'ont permis de débiter ma thèse dans d'excellentes conditions.

Je remercie également tous les gens que j'ai pu croiser et omettre au moment de la rédaction de ces quelques lignes.

Enfin « last but not least », je remercie chaleureusement ma famille et tout particulièrement mes parents sans qui rien de ceci n'aurait pu être réalisable, Jean et Evelyne, ainsi que mon frère Bastien. Je remercie affectueusement Virginie « loin des yeux mais près du cœur » pour son soutien et sa contribution dans la mise en page de cet ouvrage.

Introduction générale

Cette thèse est divisée en deux chapitres, le premier aborde l'impact des osmolytes sur la dihydrofolate réductase (DHFR), le second a pour objet l'étude structurale de peptides antimicrobiens en présence de modèles membranaires.

Avant les années 1990, les discussions et les expériences sur l'évolution biochimique se sont exclusivement concentrées sur les protéines et les acides nucléiques. Les solutés de faibles masses moléculaires, présents dans le milieu intracellulaire, ont longtemps été ignorés. Depuis deux décennies de nombreuses études, ont montré l'importance de ces osmolytes dans la modulation des réactions biochimiques. Il a ainsi été démontré que ces molécules ont un impact sur les interactions moléculaires, la solubilité et la stabilité des protéines, l'activité catalytique des enzymes et plus récemment la dynamique des macromolécules. Les solutés organiques accumulés dans la cellule ont non seulement un rôle de maintien du volume cellulaire mais présentent aussi de nombreuses propriétés pour faire face à divers stress environnementaux. Ils participent également à la protection des macromolécules et plus particulièrement des protéines.

Une étude bibliographique permettra, tout d'abord, de présenter le contexte de nos travaux, de délimiter le cadre d'étude et d'introduire des notions utiles pour la discussion. J'introduirai le phénomène osmotique puis présenterai les différentes familles d'osmolytes qui sont accumulés en réponse à un stress hyperosmotique. Nous verrons ensuite quels sont les effets de ces solutés sur les macromolécules.

Ensuite je décrirai notre étude sur le comportement de la dihydrofolate réductase (DHFR) en présence d'osmolytes. Nous avons dans un premier temps mesuré l'activité de la DHFR en présence de TMAO, tréhalose, glycine bêtaïne et glycérol. Après avoir vérifié que la structure globale de la DHFR n'était pas modifiée par les osmolytes, nous avons étudié la stabilité de la DHFR en présence d'osmolytes. Enfin, Nous avons fait des mesures de constantes cinétiques de dissociation d'analogues du produit et étudié la dynamique interne de la DHFR dans différents milieux.

Le second chapitre présente nos travaux sur la relation structure-activité de peptides et pseudopeptides antimicrobiens. Ce projet s'inscrit dans la course au développement de nouvelles molécules actives pour palier la résistance croissante des pathogènes contre les antibiotiques conventionnels. Les peptides antimicrobiens, naturels ou synthétiques,

constituent une source de molécules actives contre les agents pathogènes, offrant une alternative pour remplacer les antibiotiques actuels. Leur utilisation reste cependant limitée notamment en raison de leur dégradation rapide en milieu biologique, sous l'action des protéases. La synthèse de pseudopeptides, à durée de vie longue en milieu biologique, constitue donc une voie particulièrement intéressante pour l'obtention de molécules actives efficaces.

Dans une première partie bibliographique, je présenterai les différentes classes de peptides antimicrobiens et leurs modes d'action qui font tous intervenir des interactions avec la membrane des micro-organismes. De nombreux peptides antimicrobiens adoptent une conformation en présence de modèles membranaires, nous verrons les différents modèles utilisés lors de nos travaux. J'exposerai ensuite les résultats obtenus sur trois types de peptides particulièrement actifs et discuterai des différents modes d'actions que ceux-ci peuvent adopter. Le premier est un peptide-détergent *de novo* composé d'une tête polaire chargée positivement et d'une queue composée de résidus hydrophobes. Nous avons ensuite mesuré l'influence de l'introduction d'acides aminés modifiés au sein de séquences peptidiques. Je présenterai les études structurales d'un peptide antimicrobien naturel modifié et d'un pseudopeptide cyclique.

Sommaire

CHAPITRE I : Étude de l'impact des osmolytes sur les propriétés de la DHFR

Partie I : Introduction bibliographique

| | |
|---|-----------|
| 1. Le stress osmotique..... | 13 |
| 1.1 Définitions | 13 |
| 1.2 Le phénomène osmotique dans le monde du vivant..... | 15 |
| 1.2.1 Stress hyper- et hypo-osmotique | 15 |
| 1.2.2 Exemples d'organismes subissant des stress osmotiques importants..... | 17 |
| 1.3 La détection du stress osmotique et l'osmosignalisation. Ex : <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| 1.4 Les osmoconformères et les osmorégulateurs..... | 20 |
| 2. Les solutés accumulés lors d'un stress hyper-osmotique | 21 |
| 2.1 Les différents systèmes d'osmolytes des organismes vivants | 21 |
| 2.1.1 Les ions inorganiques..... | 21 |
| 2.1.2 Les osmolytes organiques | 22 |
| 2.2 Les autres propriétés des osmolytes organiques..... | 26 |
| 3. Effets des osmolytes sur les propriétés des protéines | 28 |
| 3.1 Effet sur l'activité des enzymes | 28 |
| 3.1.1 La notion de compatibilité..... | 28 |
| 3.1.2 Le rôle de protection de l'activité des protéines | 29 |
| 3.2 Effets sur la stabilité et le repliement des macromolécules biologiques..... | 29 |
| 3.2.1 Effets sur la stabilité des protéines | 30 |
| 3.2.2 Effets sur le repliement des protéines..... | 31 |
| 3.3 Effets sur l'association moléculaire et l'interaction entre partenaires | 32 |
| 3.4 Effets sur la dynamique interne des protéines..... | 32 |
| 4. Les bases moléculaires de l'effet des osmolytes sur les protéines | 34 |
| 4.1 La compétition eau-osmolyte à la surface de la protéine..... | 34 |
| 4.1.1 L'hydratation des protéines | 35 |
| 4.1.2 L'exclusion et la liaison préférentielle des osmolytes..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Les mécanismes moléculaires qui modifient les propriétés des protéines..... | 36 |
| 4.2.1 Le modèle de l'exclusion de volume et l'encombrement moléculaire | 37 |
| 4.2.2 L'impact de l'encombrement moléculaire sur les propriétés des macromolécules | 38 |
| 4.2.3 La balance entre l'exclusion de volume et les interactions moléculaires | 39 |
| 4.2.4 L'effet osmophile ou solvophile..... | 40 |
| 4.2.5 Synthèse..... | 42 |
| 5. Le phénomène osmotique à l'échelle macromoléculaire | 42 |
| 5.1 La contrainte osmotique pour les macromolécules | 42 |
| 5.2 Les osmolytes comme outils pour étudier les propriétés des protéines | 44 |
| 6. Notre modèle d'étude : la DHFR d'<i>E. coli</i> | 46 |
| 6.1 Métabolisme et stratégies thérapeutiques chez l'Homme | 46 |
| 6.1.1 Vue d'ensemble de la voie du folate..... | 47 |
| 6.1.2 Inhibiteurs de la DHFR et pathologies..... | 48 |
| 6.2 Séquences et structures des DHFR de différentes espèces | 49 |
| 6.3 La DHFR d' <i>E. coli</i> | 51 |
| 6.3.1 Structure globale | 51 |
| 6.3.2 Mécanisme cinétique | 52 |
| 6.3.3 Les conformations et le site catalytique de la DHFR | 53 |
| 6.3.4 La dynamique interne de la DHFR | 55 |
| 7. Objectifs de la thèse..... | 59 |

Partie II : Matériels et méthodes

| | |
|--|-----------|
| 1. Production et purification de la DHFR | 61 |
| 2. Détermination de l'activité enzymatique de la DHFR | 62 |
| 3. Le dichroïsme circulaire | 63 |
| 3.1 Principe de base du dichroïsme circulaire | 63 |
| 3.2 Dichroïsme circulaire des peptides et des protéines..... | 64 |
| 3.3 Expériences de dénaturation thermique | 66 |
| 3.4 Mesure de la stabilisation par les osmolytes | 66 |
| 3.5 Conditions et traitements des mesures par dichroïsme circulaire..... | 67 |
| 4. La spectroscopie de fluorescence..... | 68 |
| 4.1 La fluorescence des protéines..... | 68 |
| 4.2 Conditions d'études..... | 69 |

| | |
|---|-----------|
| 5. La RMN des protéines..... | 69 |
| 5.1 Le déplacement chimique | 70 |
| 5.1.1 Le déplacement chimique et les paramètres structuraux des protéines | 70 |
| 5.1.2 Le déplacement chimique pour identifier les interactions moléculaires..... | 71 |
| 5.1.3 Les conditions d'études et expériences de <i>chemical shift mapping</i> sur la DHFR | 71 |
| 5.2 Détermination des coefficients de diffusion translationnelle par RMN | 73 |
| 5.2.1 L'expérience RMN–PFGSE | 73 |
| 5.2.2 Préparation des échantillons et paramètres utilisés..... | 74 |
| 5.3 Les expériences de transfert d'aimantation..... | 75 |
| 5.3.1 Détermination du régime d'échange et des résonances du ligand lié | 75 |
| 5.3.2 Les expériences de transfert de saturation | 76 |
| 5.3.3 Mesure de constantes cinétiques de dissociation (k_{off} ou k_{-1}) | 79 |
| 5.3.4 Échantillons utilisés et paramètres des expériences de transfert de saturation | 81 |
| 5.4. Étude de la dynamique interne d'une protéine par RMN..... | 82 |
| 5.4.1 Les mouvements moléculaires..... | 82 |
| 5.4.2 La fonction densité spectrale..... | 83 |
| 5.4.3 Le phénomène de relaxation..... | 84 |
| 5.4.4 Des paramètres de relaxation aux mouvements moléculaires | 88 |

Partie III : Résultats et discussions

| | |
|---|------------|
| 1. Production, purification et contrôle de la DHFR | 93 |
| 1.1 Mesure de l'activité catalytique de la DHFR..... | 95 |
| 1.2 Spectres de dichroïsme circulaire et d'émission de fluorescence de la DHFR | 96 |
| 1.3 Spectres RMN de la DHFR | 97 |
| 2. Impact des osmolytes sur l'activité de la DHFR..... | 99 |
| 3. Impact des osmolytes sur la structure globale, la stabilité et le repliement de la DHFR | 102 |
| 3.1 La structure de la DHFR en présence d'osmolytes | 102 |
| 3.2 Effet des osmolytes sur la stabilité de la DHFR..... | 105 |
| 3.3 Étude du repliement de la DHFR après dénaturation thermique en présence d'osmolytes..... | 107 |
| 3.4 Effet des osmolytes sur la stabilité de la DHFR pour de longues durées à température ambiante..... | 108 |
| 4. Étude des interactions osmolytes-ligands ou osmolytes-DHFR | 109 |

| | |
|--|------------|
| 4.1 Influence des osmolytes sur la diffusion des ligands | 110 |
| 4.2 Analyse des déplacements chimiques et des intensités des pics de corrélation des protons amide de la DHFR..... | 111 |
| 4.3 Mesure des temps de relaxation longitudinale des osmolytes en présence de DHFR | 117 |
| 5. Mesure du k_{off} du folate et du NADP^+ en présence d'osmolytes | 119 |
| 5.1 Les déplacements chimiques du folate et du NADP^+ liés à la DHFR | 119 |
| 5.2 Impact des osmolytes sur la constante cinétique de dissociation k_{off} du folate et du NADP^+ | 120 |
| 6. Dynamique de la DHFR en présence d'osmolytes | 125 |
| 6.1 Analyse de la dynamique interne du complexe ternaire DHFR:folate: NADP^+ | 125 |
| 6.1.1 Description des données de relaxation en absence d'osmolytes..... | 128 |
| 6.1.2 Temps de corrélation et analyse des données de relaxation par le modèle model-free. | 129 |
| 6.2 Analyse de la dynamique interne du complexe ternaire DHFR:folate: NADP^+ en présence d'osmolyte | 130 |
| 6.2.1 Effet de la viscosité sur la mesure et l'analyse des données de relaxation | 130 |
| 6.2.2 Mesure et analyse des données de relaxation en présence d'osmolytes | 131 |
| 7 Conclusions et perspectives | 135 |
| Bibliographie..... | 137 |

CHAPITRE II : Peptides et pseudopeptides antimicrobiens en milieu membranaire

| | |
|--|------------|
| 1. Introduction | 152 |
| 1.1 Les différentes classes de peptides antimicrobiens..... | 153 |
| 1.1.1 Les peptides antimicrobiens naturels | 153 |
| 1.1.2 Les peptides synthétiques (de novo) | 157 |
| 1.1.3 Les pseudopeptides antimicrobiens | 160 |
| 1.1.4 Les aza- β 3-peptides | 161 |
| 1.2 Mode d'action des peptides antimicrobiens..... | 163 |
| 1.2.1 La spécificité des peptides antimicrobiens | 163 |
| 1.2.2 De l'interaction à la mort cellulaire..... | 164 |
| 1.2.3 Les modèles d'interaction peptides membranes..... | 165 |
| 1.2.4 Les mécanismes de résistance..... | 166 |
| 1.3 Etude structurale par RMN et interactions lipidiques | 167 |

| | |
|---|------------|
| 1.4 Mise en contexte et objectifs | 169 |
| 2. Matériels et méthodes..... | 170 |
| 2.1 Préparation des SUV..... | 170 |
| 2.2 Diffusion de lumière | 170 |
| 2.3 Mesure des coefficients de diffusion des peptides en présence de SUV..... | 171 |
| 2.4 Dichroïsme circulaire..... | 171 |
| 2.5 Spectroscopie RMN..... | 171 |
| 2.6 Modélisation moléculaire..... | 172 |
| 3. Peptides étudiés : résultats et discussions..... | 172 |
| 3.1 Etude d'un peptide-surfactant de novo (partie sur article)..... | 172 |
| 3.3.1 Les propriétés d'autoassociation du NafNaf..... | 235 |
| 3.3.2 Etude structurale du NafNaf dans l'eau | 237 |
| 3.3.3 Etude structurale du NafNaf en présence de modèles membranaires | 239 |
| 4. Pseudopeptides antimicrobiens : conclusions et perspectives. | 245 |
| Bibliographie..... | 247 |
| ANNEXE I..... | 259 |
| ANNEXE II | 264 |
| ANNEXE III | 268 |
| ANNEXE IV..... | 282 |

Liste des abréviations

2D : bidimensionel(le)

3D : tridimensionnel(le)

ABL : Adenosin Binding Loop

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADR : Ambiguous Distance Restraint (Contrainte de distance ambiguë)

ARN : Acide RiboNucléique

ARIA : Ambiguous distance Restraints for Iterative Assignments

CD : Circular Dichroism (dichroïsme circulaire)

CNS : Crystallography NMR System

COSY : COrrrelation SpectroscopY

DHF : DiHydroFolate

DHFR : DiHydroFolate Réductase

DLS : Dynamic Light Scattering (Diffusion de lumière)

DMPC : DiMyristoylPhosphatidylCholine

DMPS : DiMyristoylPhosphatidylSérine

DPC : DiPhosphoCholine

GB : Glycine Bétaïne

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

INEPT: Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer

MTX : MéthoTreXate

NADP(H) : NicotinAmide DiPhosphate

NMR : Nuclear Magnetic Resonance

NOE : Nuclear Overhauser Effect

NOESY : Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

PAM : Peptide AntiMicrobien

PDB : Protein Data Bank

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD : Root Mean Square Deviation

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

THF : TétraHydroFolate

TMAO : TriMéthylAmine Oxyde

TOCSY : TOtal Correlation SpectroscopY

TSP : TriméthylSilyl Propionate

UV : Ultra-Violet

Chapitre 1

Étude de l'impact des osmolytes sur les propriétés de la DHFR

PARTIE I Introduction bibliographique

L'extraordinaire capacité d'adaptation des organismes vivants liée aux processus évolutifs, ont permis la colonisation de la totalité de la surface terrestre, à l'exception des centres volcaniques actifs. Les différents biotopes, présentant des paramètres physico-chimiques très variables (température, salinité, pH, lumière, pression, ...), ont vu le développement d'écosystèmes très diversifiés. Par exemple, des organismes vivent de manière optimale à 121°C (la « souche 121 »), dans des pH compris entre 1 et 11, sous une pression hydrostatique de 1000 bars, dans des concentrations en sel de 6 M, etc. Ces organismes appelés extrêmophiles, sont pour la plupart des micro-organismes procaryotes : bactéries ou archées (1). La capacité d'un organisme à survivre et à proliférer dans un environnement dépendra de son degré d'adaptation et surtout de sa capacité à réagir à des variations de conditions.

Près de 70% de la surface de notre planète est recouverte d'eau, essentiellement sous forme liquide. L'eau est indispensable pour tous les organismes, puisque les réactions biochimiques nécessaires à la vie se déroulent en solution aqueuse. L'eau est un excellent solvant pour les molécules polaires et ioniques, elle est capable de se structurer en formant des liaisons hydrogènes, de créer des sphères d'hydratation et participe aux réactions enzymatiques. Cependant, la richesse en eau de notre planète est inégalement répartie entre les différents biotopes et les variations temporelles des paramètres physico-chimiques engendrent des stress environnementaux. Les cellules sont par exemple soumises à la dessiccation, au gel, à des variations d'osmolarité du milieu. Afin de survivre et de proliférer dans ces conditions de stress, les organismes ont alors développé des mécanismes leur permettant de s'adapter à ces modifications environnementales et de réguler leur volume cellulaire : ce sont les processus d'osmoadaptation et d'osmorégulation.

1. Le stress osmotique

1.1 Définitions

L'osmose est le phénomène de diffusion de molécules de solvant, généralement l'eau, à travers une membrane semi-perméable qui sépare deux liquides de concentrations en soluté différentes. Par définition la membrane semi-perméable ne permet pas le passage de soluté. Le solvant diffuse de la solution la moins concentrée vers la solution la plus concentrée, de

façon à équilibrer tant que possible les concentrations de part et d'autre de la membrane et à atteindre ainsi la stabilité thermodynamique (entropie maximum).

La pression osmotique se définit comme la pression minimum qu'il faut exercer sur la solution la plus concentrée pour empêcher le flux de solvant à travers la membrane semi-perméable.

On définit le potentiel osmotique Π d'une solution par la relation suivante :

$$\Pi = \frac{RT}{\bar{V}_w} \ln a_w \quad [1]$$

où R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), T est la température, \bar{V}_w est le volume molaire partiel de l'eau ($0,018 \text{ L.mol}^{-1}$) et a_w est l'activité de l'eau définie par :

$$a_w = \frac{P}{P^*} \quad [2]$$

où P et P^* sont respectivement les pressions de vapeur de la solution et de l'eau pure. L'activité de l'eau est un paramètre traduisant la disponibilité de l'eau (l'eau « libre »), par définition l'activité vaut 1 pour un solvant pur de telle sorte que le potentiel osmotique d'un solvant pur est nul. L'activité d'une solution est généralement inférieure à 1 et le potentiel osmotique est donc généralement négatif. Lorsqu'une membrane semi-perméable sépare deux solutions de potentiels osmotiques différents, le flux de solvant se fera dans le sens des potentiels osmotiques décroissants.

Pour une solution idéale – soit sans interactions entre les molécules de solvant et celles de soluté – et très diluée, on peut montrer que le potentiel osmotique s'écrit :

$$\Pi = -RTC_s \quad [3]$$

où C_s est la concentration molaire en soluté (2). Lorsque l'on est en présence de plusieurs solutés, il faut prendre en compte la totalité de ceux-ci dans la détermination de C_s . En particulier pour des solutés dissociés en solution il faut prendre en compte la totalité des ions dissous. La concentration molaire ainsi définie, tenant compte de tous les solutés sans distinction aucune liée à leur nature chimique est appelée l'osmolarité.

Pour une membrane semi-perméable séparant deux compartiments 1 et 2 de potentiels osmotiques respectifs Π_1 et Π_2 tels que $\Pi_2 < \Pi_1$ (le compartiment 2 est le plus concentré en solutés) la pression osmotique π , telle que définie précédemment, est donnée par :

$$\pi = -(\Pi_2 - \Pi_1) = RT(C_{s2} - C_{s1}) \quad [4]$$

avec C_{s1} et C_{s2} les osmolarités respectives des compartiments 1 et 2 prenant en compte les solutés auxquels la membrane est imperméable, encore appelés solutés osmotiquement actifs.

La pression osmotique est ainsi proportionnelle à la température et à la différence des osmolarités de part et d'autre de la membrane. Par contre, elle est indépendante de la nature des solutés.

Pour une membrane donnée, l'osmolarité d'une solution est donc le nombre de moles de solutés osmotiquement actifs par unité de volume de solvant, elle est exprimée en Osmoles par unité de volume. De la même façon on définit l'osmolalité comme le nombre de moles de solutés osmotiquement actifs par unité de masse de solvant. Pour les solutions aqueuses diluées, l'osmolarité exprimée en Osmol.L^{-1} (ou Osmolaire) est donc égale à l'osmolalité exprimée en Osmol.kg^{-1} .

Pour une membrane séparant une solution d'un compartiment contenant du solvant pur ($\Pi_1 = 0$) la pression osmotique π devient :

$$\pi = -\Pi_2 = RTC_{s_2} \quad [5]$$

et de façon générale on parle indifféremment de pression osmotique, de potentiel osmotique ou d'osmolarité d'une solution lorsque l'on s'intéresse au phénomène d'osmose (2-4).

1.2 Le phénomène osmotique dans le monde du vivant

L'osmose est un phénomène physique qui joue un rôle prépondérant dans le monde du vivant. Elle intervient dans la circulation de l'eau au travers des membranes cellulaires. Les propriétés osmotiques des membranes lipidiques dérivent du fait qu'elles possèdent une perméabilité sélective pour différentes substances. Elles permettent une diffusion rapide des molécules d'eau tandis qu'elles sont une barrière efficace pour les ions et la plupart des molécules biologiques. Ainsi, un choc osmotique cause un efflux ou un influx instantané d'eau, accompagné d'une modification du volume cytoplasmique.

1.2.1 Stress hyper- et hypo-osmotique

Des cellules subissent un stress hyper-osmotique si elles sont placées dans un milieu où la concentration en solutés osmotiquement actif est supérieure à celle du cytoplasme. Cette contrainte provoque un efflux massif de l'eau intracellulaire et entraîne une réduction considérable du volume cytoplasmique, c'est le phénomène de plasmolyse. La cinétique et l'ampleur de ce phénomène dépendent de l'amplitude de la différence d'osmolarité entre les milieux intra et extracellulaire et non de la nature des solutés qui ne peuvent passer la membrane. Si le choc est de courte durée, la plasmolyse est faible et transitoire, le volume

cellulaire revient rapidement à l'équilibre. Si le choc est durable mais pas trop important la plasmolyse sera modérée et n'altérera que peu le fonctionnement cellulaire. En revanche une plasmolyse importante et durable induit l'inhibition d'une variété de processus physiologiques, de l'entrée de nutriment à la réplication de l'ADN. Dans ce cas on observe également une accumulation d'ATP dans la cellule liée vraisemblablement à une inhibition de la biosynthèse des macromolécules (2).

À l'inverse, un stress hypo-osmotique induit un influx des molécules d'eau dans le cytoplasme. Tandis que les globules rouges gonflent (phénomène de turgescence) puis explosent (phénomène d'hémolyse) pour des pressions osmotiques relativement faibles, les bactéries possèdent une paroi pouvant supporter des pressions jusqu'à 100 atm. L'augmentation du volume cellulaire est alors mineure lors d'un stress hypo-osmotique. La pression de la membrane, appliquée sur la paroi bactérienne, est appelée pression de turgescence (ΔP). Elle correspond à la pression osmotique entre le cytoplasme et le milieu extérieur et s'écrit :

$$\Delta P = -(\Pi_{\text{milieu}} - \Pi_{\text{cytoplasme}}) = RT(C_{\text{cytoplasme}} - C_{\text{milieu}}) \quad [6]$$

avec $C_{\text{cytoplasme}}$ et C_{milieu} les osmolarités respectives du cytoplasme et du milieu extérieur.

Ces phénomènes de turgescence et de plasmolyse peuvent être observés pour des cellules végétales sur la Figure 1.

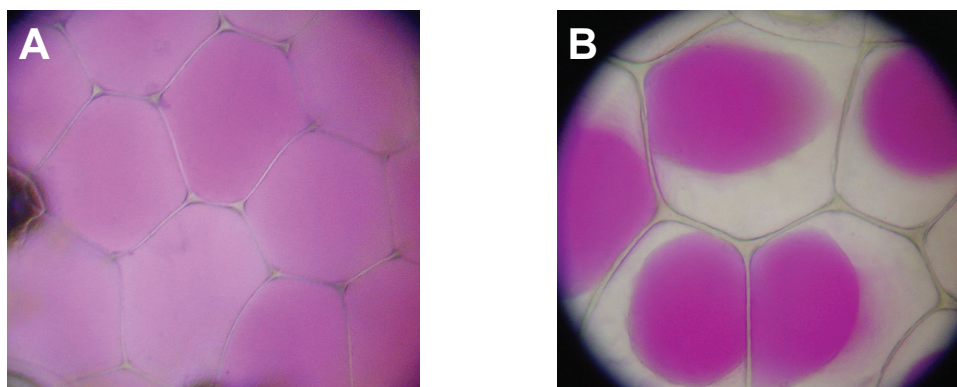


Figure 1 : Cellules de l'épiderme du bulbe de l'oignon rouge¹, (A) turgescences, (B) en plasmolyse. On observe parfaitement le cytoplasme des cellules grâce aux anthocyanes (violet) accumulés dans la vacuole. On remarque, lors de la plasmolyse, la réduction du volume cytoplasmique et le décollement de la membrane de la paroi pecto-cellulosique.

¹ <http://www.xonk.de/bilder/Botanik/Lernmaterial/>

1.2.2 Exemples d'organismes subissant des stress osmotiques importants

Les conditions les plus stressantes existent pour les organismes qui subissent le stress osmotique environnemental, notamment par des salinités importantes ou variables, la dessiccation ou le gel. On trouve des organismes vivants dans l'eau douce ou des eaux saturées en sel, qui sont confrontés à des problèmes de gain ou de perte d'eau liés aux variations de pression osmotique. Les espèces euryhalines subissent des variations de la pression osmotique importantes. Les xérophytes terrestres et les insectes ont des pertes d'eau continues ou saisonnières liées à des formes de dormance : l'estivation, la production de graines ou de kystes (parfois nommée cystes), l'état larvaire anhydrobiotique (2).

1.3 La détection du stress osmotique et l'osmosignalisation. Ex : *Escherichia coli*

Les cellules sont sensibles au stress osmotique, pour les cellules animales qui ne possèdent pas de paroi, une pression de turgescence trop importante peut conduire à l'éclatement de la cellule lors d'un choc hypo-osmotique. De même, lors d'un choc hyper-osmotique, la plasmolyse inhibe fortement le métabolisme cellulaire. Comment la cellule détecte-t-elle une variation de pression osmotique ? Quels sont les systèmes mis en place pour réguler la pression osmotique intracellulaire ?

Les osmosenseurs sont des protéines qui détectent des modifications de l'activité de l'eau ou des modifications qui en résultent comme la forme ou la composition de la cellule et déclenchent l'osmorégulation. Ils répondent avec la même activité aux solutions aqueuses isotoniques quelles que soient leurs compositions en soluté. Les études les plus détaillées sur l'osmodétection ou l'osmosignalisation ont été effectuées sur les osmosenseurs membranaires des eubactéries. Leur système d'osmorégulation est composé de transporteurs osmosensibles, de protéines histidine-kinase qui régulent le système transcriptionnel et de canaux mécanosensibles. De plus, la pression osmotique contrôlerait la transcription bactérienne sans utiliser ces mécanismes de senseurs et de transduction de signaux (4, 5).

- Lors d'un stress hypo-osmotique, les canaux mécanosensibles MscK (*mechanosensitive channel K⁺ regulated*), MscL, MscS et MscM (*mechanosensitive channel of large, small et mini conductance*) s'ouvrent en réponse à une tension membranaire. Si MscK est spécifique de l'ion K⁺ (6), les autres canaux libèrent des solutés de manière aspécifique entraînant un

efflux d'eau *via* les aquaporines (7-9). Le nom de ces canaux dépend de leurs conductances en corrélation directe avec leur perméabilité et leur seuil d'activation (10, 11). Ils sont encadrés en bleu sur la Figure 2.

- Lors d'un stress hyper-osmotique, des transporteurs osmosensibles peuvent détecter des modifications de la pression osmotique et répondre en permettant l'entrée de molécules osmotiquement actives sans l'assistance d'autres protéines.

La première réponse physiologique d'*E. coli* à un stress hyper-osmotique est l'accumulation rapide d'ions potassium K^+ (12). Ils participent à l'homéostasie de la cellule (13) et la concentration intracellulaire de K^+ peut varier de 0,1 à 1 M (14). Le transport d'ions K^+ est assuré par des systèmes de transporteurs de faible affinité de type Trk et de haute affinité de type Kdp. Tandis que le système Trk est exprimé de manière constitutive, l'expression du système Kdp est régulée par le système à deux composantes KdpD/E sous la dépendance de la disponibilité en K^+ dans le milieu extracellulaire et du stress hyper-osmotique. Dans la plupart des conditions de culture, *E. coli* utilise le système Trk et la synthèse du système Kdp est totalement réprimée. Néanmoins lorsque la concentration en potassium extracellulaire est faible et que la cellule requiert une forte accumulation en réponse à une contrainte importante, le système Kdp, très efficace de par sa forte affinité pour l'ion K^+ , devient actif (4).

KdpD et EnvZ sont des kinases à histidines ancrées dans la membrane, qui détectent les variations de pression osmotique et activent des régulateurs pour moduler la transcription. KdpD active KdpE qui déclenche la transcription des gènes codant pour l'ATPase Kdp. EnvZ active OmpR qui régule la transcription de nombreux gènes, dont ceux codant pour les aquaporines OmpC et OmpF ancrées dans la membrane externe (15, 16). Les éléments impliqués dans la réponse primaire sont encadrés en jaune sur la Figure 2.

La réponse secondaire est l'accumulation de molécules organiques grâce aux transporteurs ProP, ProU, BetT et BetU qui détectent des modifications de la pression osmotique et s'activent sans l'assistance d'autres protéines (encadrés en vert sur la Figure 2). De plus des composés comme la glycine bêtaïne ou le tréhalose peuvent être synthétisés grâce aux enzymes BetA et BetB, OtsA et OtsB pour augmenter la pression osmotique intracellulaire (17-19). La vitesse du passage de l'eau à travers les membranes est augmentée grâce à l'ouverture de canaux, comme l'aquaporine AqpZ, encadrée en bleu sur la Figure 2.

Tous ces systèmes de détection et de régulation de la pression osmotique de la cellule sont représentés sur la Figure 2 (4).

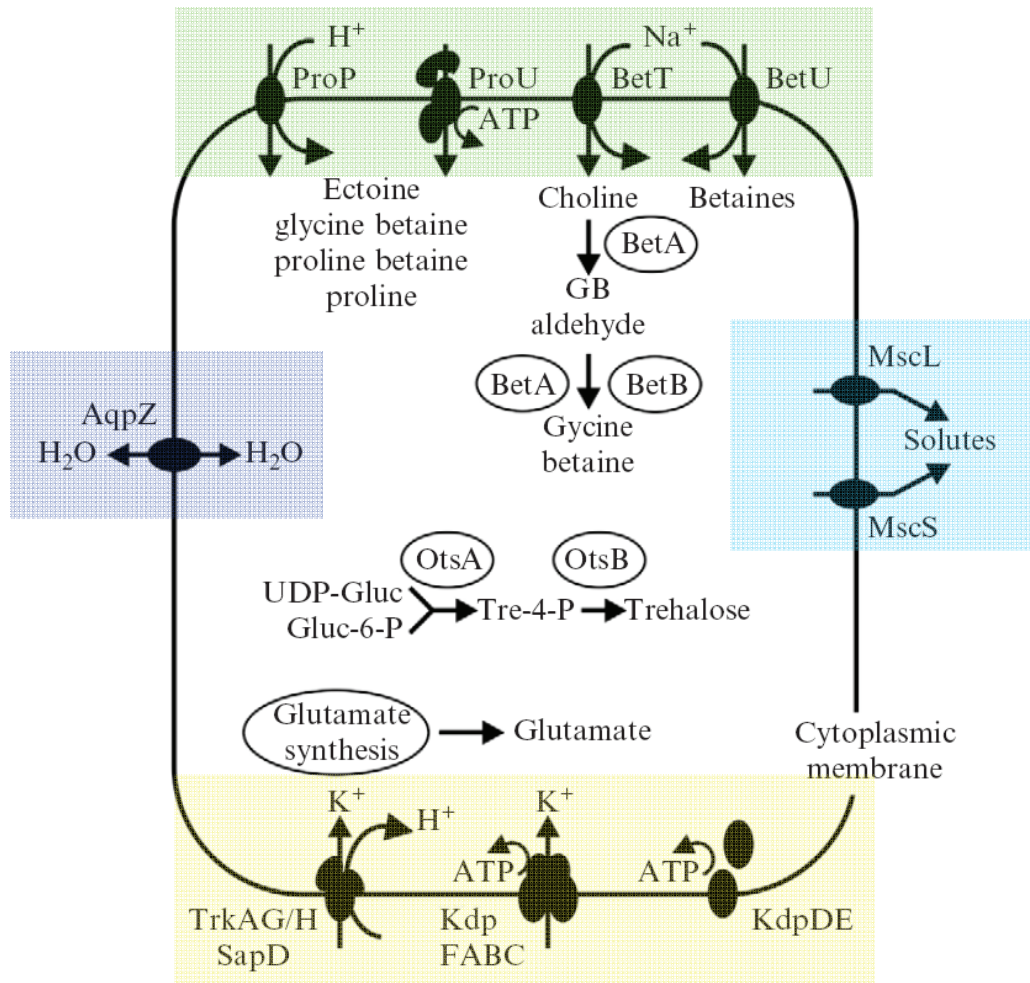


Figure 2 : Schéma du système d'osmorégulation d'*Escherichia coli*. La membrane externe n'est pas représentée par souci de clarté. (4)

Certains osmosenseurs détectent directement l'activité de l'eau, comme un récepteur détecte un ligand. Par exemple, ProP est un osmosenseur direct dont l'activité est déterminée par sa propre hydratation (19). Comme les modifications de pression osmotique altèrent de nombreuses propriétés cellulaires, d'autres osmosenseurs pourraient détecter indirectement les modifications du volume de la cellule, de la pression de turgescence, de la force ionique ou encore l'encombrement des macromolécules dans le cytoplasme. Les canaux mécanosensibles sont des osmosenseurs indirects qui s'ouvrent en réponse à une tension membranaire induite par la pression hydrostatique. BetP et ProU sont des osmosenseurs indirects, qui détectent la concentration cytoplasmique en K^+ et la force ionique. Les osmosenseurs sont remarquables car ils sont sensibles à de nombreux et divers phénomènes liés à la contrainte osmotique. Ils permettent d'activer le transport d'ions inorganiques, ou le transport et la biosynthèse de molécules organiques afin de provoquer un efflux ou un influx rapide d'eau

par diffusion et *via* les aquaporines (OmpC, OmpF et AqpZ), rétablissant ainsi l'équilibre osmotique après un choc osmotique (4). Ces molécules sont appelées des osmolytes.

Globalement, les organismes sont classés en deux grandes catégories selon leur stratégie d'adaptation au stress osmotique : les osmoconformères qui accumulent des osmolytes organiques pour garder leur pression osmotique constante et les osmorégulateurs qui utilisent le transport d'ions pour réguler homéostatiquement leur pression osmotique interne. Cependant nous allons voir dans la partie suivante que certains organismes peuvent à la fois être osmoconformères et osmorégulateurs, suivant les variations de composition de leur milieu. (20).

1.4 Les osmoconformères et les osmorégulateurs

Les osmoconformères sont plus communément présents dans les océans, cette catégorie englobe la plupart des organismes à l'exception de la majorité des vertébrés. Les sels (principalement NaCl) de l'eau des océans ont une osmolarité de $\sim 1000 \text{ mOsm.L}^{-1}$, bien au dessus des $\sim 300\text{-}400 \text{ mOsm.L}^{-1}$ créés par les solutés typiques de la plupart des cellules (K^+ , métabolites, protéines, etc.). Pour éviter la plasmolyse, les composés osmotiquement actifs accumulés dans les cellules sont des osmolytes organiques, bien que les fluides extracellulaires des organismes multicellulaires soient riches en NaCl. Il est particulièrement surprenant de constater que des organismes phylogénétiquement aussi différents que des bactéries, des champignons, des levures, des algues unicellulaires, des plantes et des vertébrés accumulent des molécules identiques ou de même famille (20).

La catégorie des osmorégulateurs est composée de vertébrés présents pour la plupart dans les océans, autres que les myxines, les coelacanthes et les élasmobranches (requins, raies, etc.) qui sont assez différents. Ces animaux ont des organes régulateurs (ex : les reins, les branchies) qui travaillent pour garder les fluides internes à une osmolarité de $\sim 400 \text{ mOsm.L}^{-1}$ ou moins pour les espèces marines. C'est le patrimoine hérité des vertébrés terrestres qui ont typiquement une pression osmotique de $\sim 300 \text{ mOsm.L}^{-1}$ dans leur fluide corporel. Cependant il y a des exceptions, avec certains osmorégulateurs qui utilisent des osmolytes organiques dans certains cas. Par exemple, chez les mammifères qui sont des osmorégulateurs, les cellules de la substance médullaire du rein accumulent des osmolytes organiques pour des pressions osmotiques importantes (21). De plus, des poissons osmorégulateurs en eau profonde peuvent accumuler des concentrations importantes de solutés organiques qui sont

très utilisés par les osmoconformères (20). Enfin, le polychète *Nereis diversicolor* qui vit dans la vase des estuaires adopte différentes stratégies suivant la salinité de son milieu. Quand la salinité varie entre 35 g/L et 8 g/L, il est osmoconforme et si la salinité chute sous 8g/L, il devient osmorégulateur (22). Nous allons maintenant voir les différents types de solutés accumulés lors d'un stress hyperosmotique.

2. Les solutés accumulés lors d'un stress hyper-osmotique

Les osmolytes sont des composés ubiquitaires de faibles masses moléculaires, utilisés par les organismes vivants pour répondre aux stress environnementaux ou pour réguler finement des propriétés moléculaires dans la cellule. Depuis des décennies, les discussions et les expériences sur l'évolution biochimique se sont concentrées sur les macromolécules, les protéines et les acides nucléiques. Les ions inorganiques et les molécules organiques, qui sont les solutés osmotiquement actifs présents dans toutes les cellules, ont longtemps été ignorés. Ces substances font partie du milieu où se déroulent les réactions biochimiques des organismes et modulent l'activité de l'eau si importante à l'activité des enzymes. Dès lors, il est probable que la composition des cellules en soluté ait subi une forte pression de sélection au cours du processus évolutif.

2.1 Les différents systèmes d'osmolytes des organismes vivants

2.1.1 Les ions inorganiques

Les archées, les bactéries halophiles et les halophytes, accumulent des sels, principalement du chlorure de potassium (KCl), pour équilibrer leur pression osmotique intracellulaire (23, 24). Chez beaucoup d'organismes, l'influx rapide de potassium K^+ est la première réaction à un stress hyper-osmotique, avant l'accumulation de composés organiques si le stress perdure, comme on l'a vu précédemment pour *E. coli*. L'ion Na^+ est particulièrement utilisé dans les océans, ainsi les poissons téléostéens ingèrent de l'eau de mer pour réguler leur pression osmotique intracellulaire par exemple (25).

Bien que de nombreuses fonctions biochimiques nécessitent des ions spécifiques, l'augmentation de la concentration intracellulaire mène souvent à l'inhibition de la fonction cellulaire. Les effets délétères du KCl et le NaCl sur l'activité de différentes enzymes de plantes ou d'animaux de différents biotopes ont été démontrés (26-28). Seuls les halophiles

extrêmes possèdent une batterie d'enzymes, dont les activités sont optimales uniquement pour des forces ioniques importantes. Par conséquent, de manière générale, l'utilisation de solutés inorganiques pour contrebalancer les effets du stress hyper-osmotique apparaît comme étant un système non optimal et primaire par rapport à l'utilisation d'osmolytes organiques.

2.1.2 Les osmolytes organiques

La plupart des organismes utilisent des solutés organiques plutôt que des sels pour protéger la cellule. Ces solutés peuvent être classés en trois grandes familles : polyols, acides aminés, et des combinaisons de méthylamines et d'urée. La plupart de ces osmolytes ont une charge nette nulle, les plus courants sont répertoriés dans la Figure 3 (29).

- Les polyols incluent le glycérol, l'inositol, le sorbitol, le tréhalose, le saccharose, etc., des dérivées comme le *o*-méthyl-inositol et quelques polyols sont anioniques comme le glucosylglycérate. Les polyols sont présents dans beaucoup d'algues unicellulaires, certaines plantes tolérantes au sel et de nombreux insectes exposés au gel. Dans tous les cas, ils permettent la rétention d'eau et lorsque la concentration de polyols accumulée est faible, ils ont peu d'impact sur la fonction des macromolécules (30).

- Les acides aminés (proline, glycine, alanine etc.) et des dérivés (ectoïne, β -alanine, taurine etc.) sont les solutés majeurs utilisés par des organismes phylogénétiquement très différents comme les bactéries tolérantes au sel (mais pas les halophiles), les halophytes, les invertébrés marins et les myxines. On constate que seuls quelques types d'acides aminés sont utilisés pour le maintien de la pression osmotique suggérant que tous les acides aminés ne sont pas compatibles avec la fonction cellulaire. Les acides aminés chargés comme l'arginine ou la lysine ont des effets délétères sur la fonction cellulaire (28). De nombreuses plantes tolérantes au sel accumulent des concentrations importantes de proline, c'est l'osmolyte majoritairement accumulé en cas de stress. Il a d'ailleurs été démontré que diverses familles d'enzymes d'halophytes sont insensibles à une grande gamme de concentration en proline (26).

- L'urée est un composé présent dans de nombreux organismes. Il constitue un produit important du métabolisme azoté et est accumulé comme osmolyte majoritaire chez certains organismes. Par exemple, les poissons cartilagineux et les cœlacanthes ont une concentration moyenne en urée qui atteint 400 mM alors que l'urée a des effets néfastes sur les protéines

(31, 32). A de rares exceptions, les protéines de ces poissons sont aussi sensibles à la dénaturation chimique par l'urée que les protéines homologues des espèces qui n'utilisent pas l'urée comme osmolyte (33, 34).

On constate que l'urée est accumulée en présence d'autres molécules, les méthylamines, qui contrebalancent son effet déstabilisant envers les macromolécules. Les méthylamines comme le TMAO, la proline bêtaïne, la glycine bêtaïne ou la sarcosine ont un effet contrecarrant l'effet de l'urée qui est optimal, *in vitro*, pour des rapports d'environ 2:1 quelle que soit l'espèce d'origine de la protéine étudiée. Ce phénomène s'observe sur une grande gamme de concentrations en urée et en méthylamines, son efficacité dépend uniquement des concentrations relatives en urée et en méthylamines dans la cellule (35). Chez certaines espèces d'invertébrés les méthylamines sont accumulées pour contrebalancer l'effet du sel (32, 36).

Par exemple, certains halophiles dont certaines plantes accumulent des concentrations importantes de glycine bêtaïne pour contrecarrer l'effet de l'accumulation de sels (37). Certains vertébrés utilisent cette combinaison d'urée et de méthylamines comme la grenouille des mangroves *Rana cancrivora* (38) et le crapaud *Xenopus leavis* (39). D'autres animaux utilisent seulement l'urée comme stratégie osmotique. En particulier ceux qui subissent des transitions d'un état actif à un état de dormance en réponse à une réduction de la disponibilité de l'eau dans leur environnement. C'est le cas par exemple, des escargots pulmonates *Bulimulus dealbatus* (40) et du dipneuste africain (41). L'urée possède alors un double rôle de rétention d'eau et d'inhibition réversible de certaines enzymes du métabolisme énergétique.

Quelques exemples d'organismes de phylogénie éloignée, avec leurs systèmes d'osmolytes sont répertoriés dans la Figure 3 et le Tableau 1.

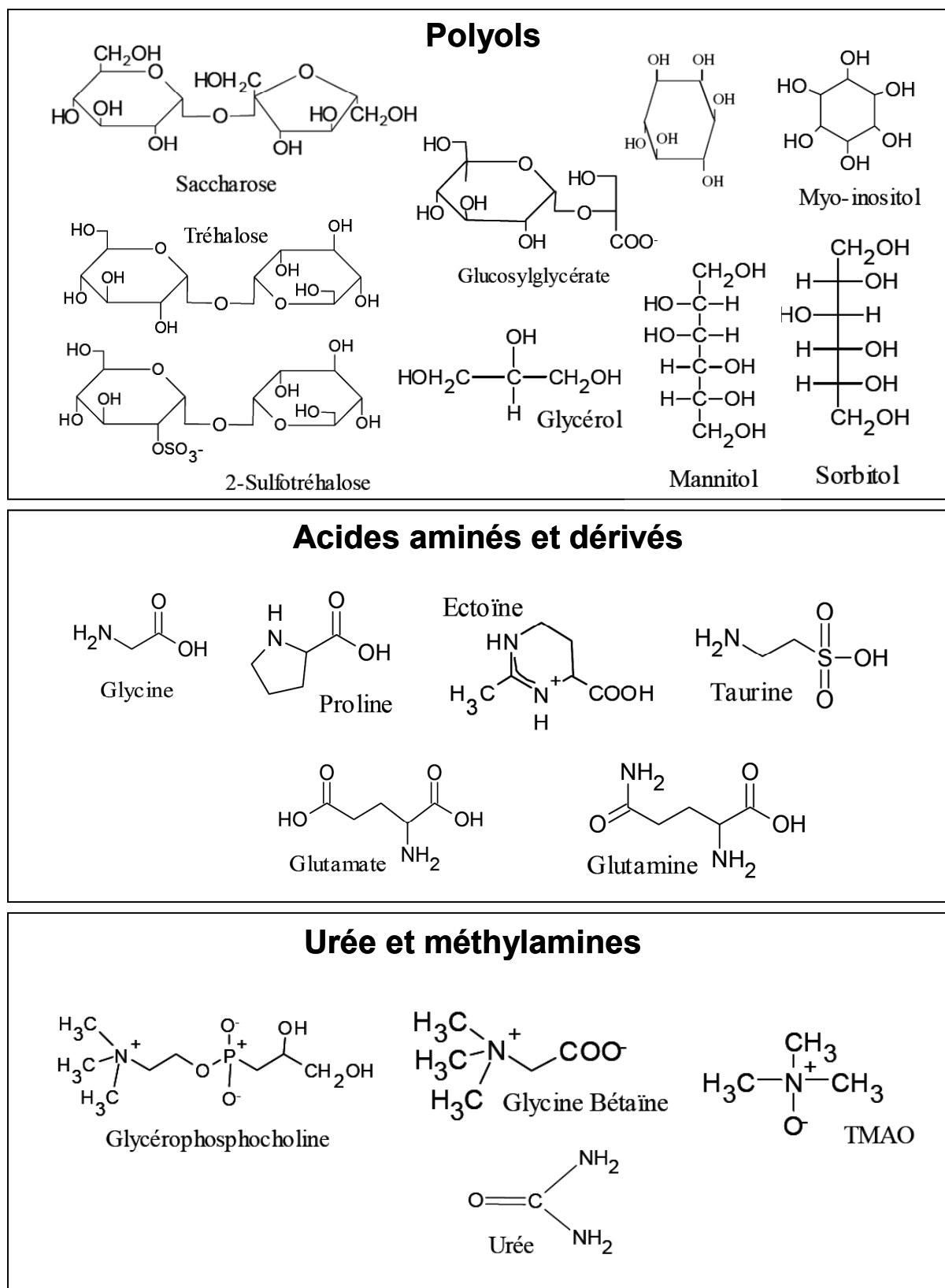


Figure 3 : Les familles d'osmolytes organiques avec quelques exemples d'osmolytes.

2. Les solutés accumulés lors d'un stress hyper-osmotique

| Organismes | Principaux osmolytes accumulés |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Polyols | |
| Cyanobactéries | |
| <i>Synechococcus sp.</i> | Glucosylglycerol |
| Champignons | |
| <i>Saccharomyces rouxii</i> | Arabitol |
| <i>Asteromyces cruciatus</i> | Arabitol, glycérol, mannitol |
| Lichens | |
| <i>Lichina pygmaea</i> | Mannosidomannitol |
| Algues unicellulaires | |
| <i>Uniallella sp.</i> | Glycerol |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | sucrose |
| <i>Ochromonas malhamensis</i> | Isofloridoside |
| Algues multicellulaires | |
| <i>Fucus spp.</i> | Mannitol |
| Plantes vascularisées | |
| <i>Gossypium hirsutum L.</i> | Glucose, fructose, sucrose |
| Insectes (tolérant au gel) | |
| <i>Eurosta solidaginis</i> | Glycérol, sorbitol |
| <i>Bracon cephi</i> | Glycérol |
| Crustacées | |
| <i>Artemia salina</i> | Glycérol |
| Vertébrés | |
| <i>Hyla versicolor</i> | Glycérol |
| Acides aminés et dérivés | |
| Eubactéries | |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> | Glutamate, proline |
| <i>Salmonella oranienburg</i> | Glutamate, proline |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | Acide γ -butyrique, proline |
| Protozoaires | |
| <i>Miemiensis avidus</i> | Glycine, alanine, proline |
| Plantes vasculaires | |
| <i>Aster tripolium</i> | Proline |
| <i>Mesembryanthemum nodiflorum</i> | Proline |
| Invertébrés | |
| <i>Invertébrés marins</i> | Acides aminés variés |
| Cyclostomes | |
| <i>Myxine glutinosa</i> | Acides aminés variés |
| Amphibiens | |
| <i>Bufo marinus</i> | Acides aminés variés |
| Urée et méthylamines | |
| Plantes vasculaires | |
| <i>Spartina townsendii</i> | Glycine bétaine |
| <i>Atriplex spongiosa</i> | Glycine bétaine |
| Poissons cartilagineux | |
| <i>Latimeria</i> | TMAO, urée |
| <i>Squalus acanthias</i> | TMAO, urée |
| <i>Dasyatis americana</i> | TMAO, urée |
| Ions inorganiques | |
| Archaeobacteria | |
| <i>Halobacterium spp.</i> | K ⁺ |

Tableau 1 : Répartition des systèmes d'osmolytes dans la biosphère. Les références de ces études sont dans la revue de Yancey et collaborateurs. (29)

En général, toutes ces catégories d'osmolytes sont largement répandues, à l'exception de l'urée. Par exemple, la glycine bétaine est présente dans tous les règnes de la vie. De même, la taurine est fréquemment rencontrée chez les animaux marins et est accumulée dans certains

organes des mammifères. Les sucres et les polyols sont présents chez les archées, les champignons, les algues, les plantes, les reins des mammifères. Ces composés sont habituellement observés chez les organismes qui tolèrent ou évitent le gel, comme les plantes terrestres, les insectes, les amphibiens. Le plus souvent, les organismes utilisent des mélanges complexes d'osmolytes et non un seul type d'osmolyte dans leur stratégie de résistance au stress osmotique (29). Par exemple, *E. coli* accumule jusqu'à 0,75 M d'ions K^+ , 1 M de tréhalose et 0,7 M de glycine bêtaïne comme osmolytes majeurs (42).

2.2 Les autres propriétés des osmolytes organiques

Certains osmolytes sont des osmoprotecteurs, on désigne par ce terme les solutés organiques qui stimulent la croissance des cellules seulement en présence d'un stress osmotique. Ainsi, beaucoup d'osmolytes ne sont pas physiologiquement inertes, ils participent au métabolisme et s'engagent dans des réactions afin de protéger les cellules de manière autre qu'une simple protection osmotique. Les osmolytes peuvent avoir des propriétés antioxydantes, maintenir la balance redox de la cellule, détoxifier les cellules des sulfites et des sulfates, protéger les cellules du gel, des hautes températures et de la dessiccation, de l'anémie, etc. (20). On peut citer quelques exemples et une liste non exhaustive des propriétés des osmolytes est présentée dans le Tableau 2.

La taurine est l'osmolyte majeur de beaucoup d'invertébrés marins. Elle est également présente dans les cellules du cœur et du cerveau des mammifères où elle est accumulée en cas de sévère déshydratation (43, 44). Cet osmolyte est essentiel pour le développement neuronal sans relation avec l'équilibre osmotique. On pense que ce composé est un antioxydant, un modulateur du calcium, un neuromodulateur synaptique et un stabilisateur de membrane. La plupart de ces effets apparaît être indirecte par modification de l'action d'autres composés (45).

Le cyclitol et le mannitol accumulés par les plantes pour la rétention d'eau, permettent aussi d'éliminer les radicaux libres générés pendant la sécheresse, le froid et d'autres stress. La taurine ne peut pas éliminer les radicaux libres mais semble stimuler d'autres fonctions cellulaires antioxydantes (46). La glycine bêtaïne est aussi impliquée dans la réduction de la peroxydation des lipides chez les plantes (47).

Pour survivre en dessous du point de congélation de l'eau, de nombreux organismes accumulent des concentrations importantes de molécules antigel et de cryoprotecteurs qui

appartiennent à la famille des polyols comme le glycérol, le tréhalose ou le sorbitol. Il est remarquable que les polyols aient été sélectionnés comme molécules anti-congélation indépendamment dans différents taxons. Ils ont peu d'impact sur le métabolisme, sont faciles à synthétiser et ils passent facilement à travers les membranes. De plus, ils constituent une source d'énergie pour la reprise de l'activité métabolique après la décongélation (48).

Nous avons vu précédemment que les méthylamines contrecarrent l'effet dénaturant de l'urée, mais il est également proposé que l'accumulation de TMAO permette de contrer l'effet dénaturant de la pression hydrostatique sur les protéines des espèces marines. On observe en effet que les concentrations intracellulaires de TMAO augmentent avec la profondeur à laquelle les différentes espèces évoluent et que cette évolution est même observable au sein d'une même espèce (20).

Il a également été démontré que les osmolytes (TMAO, glycine bêtaïne, glycérol et proline) permettent d'activer des chaperonnes moléculaires dans des conditions de stress salin et thermique (49).

| Propriétés | Osmolytes |
|--|--|
| Contrecarre l'effet de l'urée | Méthylamines (TMAO, ex: le requin) |
| Augmente la thermostabilité | Tréhalose, polyols anioniques (ex : archées) |
| Protège les membranes du gel | Tréhalose, proline (ex: insectes) |
| Préserve à l'état anhydre | Polyols (Tréhalose, ex: levure à l'état anhydre) |
| Contrecarre l'effet des sels | Méthylamines (ex : plantes des marais salants) |
| Contrecarre l'effet de la pression hydrostatique | TMAO, autres solutés (poissons des mers profondes) |

Tableau 2 : Résumé des rôles de protection de différents osmolytes (20).

Les osmolytes sont aisément interchangeables, une cellule peut être protégée du stress osmotique par une variété d'osmolyte qu'elle n'utilise pas habituellement. Par exemple, la croissance d'*Escherichia coli* en milieu de croissance salin peut être accélérée par des variétés d'osmolytes ajoutés au milieu que les bactéries n'utilisent pas normalement. Toutefois, les osmolytes ne sont pas accumulés uniquement pour réguler la pression osmotique et l'utilisation d'un osmolyte particulier est fonction de ses propriétés intrinsèques permettant de lutter contre d'autres stress ainsi que du métabolisme de l'organisme. Ceci peut expliquer que malgré leur interchangeabilité, il y ait une gamme aussi large d'osmolytes (20).

Par conséquent, la variabilité des systèmes d'osmolytes est sans relation directe avec l'osmorégulation, d'ailleurs les osmosenseurs ne réagissent pas à la nature de l'osmolyte mais de manière directe ou indirecte à la tonicité du milieu, comme on l'a vu précédemment. Ainsi,

la compatibilité des osmolytes avec la fonction cellulaire n'est probablement pas la seule pression de sélection pour l'adoption d'un système d'osmolyte par un organisme.

3. Effets des osmolytes sur les propriétés des protéines

La cellule est le siège de nombreuses réactions biochimiques. À l'échelle moléculaire, le fonctionnement de la cellule est possible à travers des interactions entre macromolécules en milieu aqueux. Les protéines se déplient et se replient, interagissent entre elles, avec les lipides, avec les acides nucléiques, les ligands s'associent et se dissocient, etc. Les effets protecteurs des osmolytes observables à l'échelle de la cellule sont donc le fruit de l'interaction des osmolytes sur les macromolécules biologiques.

3.1 Effet sur l'activité des enzymes

L'augmentation de la concentration intracellulaire de sel mène souvent à l'inhibition de la fonction cellulaire de par son impact sur le métabolisme et sur le potentiel transmembranaire. Les sels diminuent l'affinité des ligands pour les enzymes et affectent donc leur vitesse de catalyse. Il est admis que les interactions électrostatiques attractives essentielles pour les associations moléculaires sont fortement atténuées par l'écrantage des charges par les ions. Au contraire, les osmolytes organiques, à l'exception de l'urée, impactent faiblement la stabilité et l'activité des protéines, ce sont des solutés « compatibles » (29, 37).

3.1.1 La notion de compatibilité

Les osmolytes organiques sont typiquement appelés solutés « compatibles » car ils inhibent relativement peu l'activité des protéines même à des concentrations importantes, pouvant dépasser 1 M. Ils peuvent être accumulés et libérés dans l'espace intracellulaire avec peu d'impact sur le métabolisme cellulaire, en contraste avec les ions. La compatibilité des osmolytes peut s'expliquer par leur charge nette nulle. En effet, la plupart des osmolytes sont neutres à pH physiologique (zwitterioniques ou sans charge), ce qui favoriserait l'absence d'interaction avec les macromolécules.

La notion de compatibilité a été introduite dans les travaux de Brown et Simpson (30), en constatant que lorsque plusieurs solutés peuvent être accumulés c'est le moins néfaste qui est accumulé. Ainsi, *Saccharomyces rouxii* accumule de l'arabitol comme composé majoritaire

lors d'un stress hyperosmotique induit par une forte concentration en saccharose dans le milieu. Malgré sa grande disponibilité, le saccharose n'est pas utilisé comme osmolyte car il est moins compatible que l'arabitol. En effet, l'isocitrate déshydrogénase de cet organisme est plus inhibée en présence de saccharose pour des concentrations équivalentes. Par la suite, ils remarquèrent que la glucose-6-phosphatase déshydrogénase de deux espèces de l'algue euryhaline *Dunaliella* n'est pas affectée par 4 M de glycérol, ce qui n'est pas le cas en présence de KCl et NaCl (50).

La compatibilité des osmolytes n'est pas due à des adaptations des protéines des organismes, mais est liée aux propriétés intrinsèques des polyols et des acides aminés libres. Pour l'urée et les méthylamines, le constat est relativement différent, puisqu'il a été démontré que lorsque ces osmolytes sont utilisés de manière séparée, ils inhibent l'activité des enzymes (20). Cependant comme on l'a vu précédemment, ils sont le plus souvent accumulés de manière combinée. Dans la suite du manuscrit, le terme osmolyte désignera uniquement les osmolytes organiques.

3.1.2 Le rôle de protection de l'activité des protéines

Au delà de leur utilisation pour réguler la pression osmotique intracellulaire sans perturber le fonctionnement des enzymes, *in vitro*, les osmolytes permettent même le fonctionnement d'enzymes dans des conditions où elles ne sont pas actives (51). En effet, les osmolytes augmentent significativement la température T_{150} à laquelle l'enzyme perd 50% de son activité. Ils ont un rôle de thermoprotection. On observe que les enzymes récupèrent beaucoup plus vite leur activité après un choc thermique ou l'ajout d'un agent dénaturant comme le chlorure de guanidium ou l'urée, si des osmolytes sont présents. Cette protection de l'activité des enzymes est intimement liée aux propriétés stabilisatrices des osmolytes vis-à-vis de la structure des macromolécules (49).

3.2 Effets sur la stabilité et le repliement des macromolécules biologiques

La structure d'une protéine en solution est dépendante de sa composition en acide aminé, de la séquence de ces résidus et de la composition du milieu. A l'équilibre, les conformations des macromolécules sont concentrées autour d'une conformation qui correspond à la structure de plus basse énergie. C'est la structure la plus stable, l'état natif de la protéine. Le repliement

des protéines est un processus physico-chimique complexe, durant lequel les polymères d'acides aminés susceptibles de posséder de nombreuses conformations adoptent finalement cette structure native. Etant donné la complexité de la réaction, les nombreuses molécules dans l'environnement cellulaire et la tendance à s'agréger, il n'est pas surprenant de constater un taux d'échec important de synthèse *de novo* dans la cellule. La structure native ainsi que la distribution des autres états conformationnels de faibles niveaux d'énergie est fonction de la composition du milieu (52). Les travaux de F. Hofmeister et d'autres groupes ont permis de souligner l'influence de la composition du milieu sur la solubilité (53) et la stabilité (54) des protéines. Récemment les osmolytes ont également été classés d'après leurs effets stabilisateurs (55).

3.2.1 Effets sur la stabilité des protéines

On évalue la stabilité thermique d'une protéine en mesurant la température de fusion T_m d'une protéine. La température de fusion ou température de demi-dénaturation d'une protéine correspond à la température pour laquelle 50% des protéines sont dépliées. Plus T_m augmente, plus l'enzyme est stable, car l'énergie à fournir pour dénaturer l'enzyme sera plus importante. On peut également mesurer la stabilité chimique en ajoutant des concentrations croissantes en urée, qui au-delà de son rôle d'osmolyte *in vivo*, est classiquement utilisé comme agent dénaturant *in vitro* (56).

L'ajout d'osmolytes dans le solvant, à l'exception de l'urée, augmente la T_m et stabilise les macromolécules biologiques en solution (29). Par exemple, des études ont montré que le lysozyme, l'ovalbumine, la conalbumine et l' α chymotrypsinogène sont plus stables en présence de polyols (57). La glycine, la proline, le saccharose et le DMSO réduisent la vitesse d'inactivation, défavorisent les modifications conformationnelles et stabilisent l'état natif de la créatine kinase lorsqu'elle est en présence de chlorure de guanidinium (58). La glycine bêtaïne et la proline sont capables de protéger, *in vitro*, contre la dénaturation thermique, des enzymes telles que la glucose-6-phosphate déshydrogénase, l'hexokinase et la pyruvate carboxylase (59), ou encore le lysozyme (60).

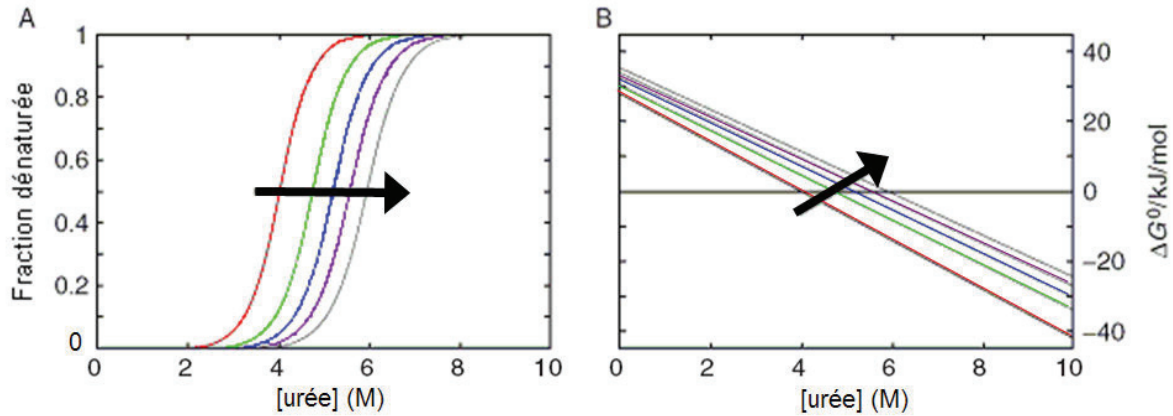


Figure 4 : Étude sur la stabilité de la protéine FKBP12 en fonction de la concentration en urée, en présence de 1 M de différents osmolytes stabilisateurs. La flèche grise indique l'effet stabilisateur croissant du glycérol, de la proline, de la sarcosine, et du TMAO par rapport à l'eau. (61)

Ainsi, la T_m dépend linéairement de la concentration en osmolytes, indépendamment de la nature de la protéine. Néanmoins, l'importance de la variation de stabilité n'est pas homogène et dépend des couples enzymes/osmolytes. Ce comportement n'est cependant pas vérifié pour un osmolyte qui porte une charge comme le chlorure de guanidium (agent dénaturant) ou encore le glucosylglycérate (polyol stabilisateur ionique) (61). Les mécanismes moléculaires responsables de la linéarité de la stabilisation des protéines en fonction de la concentration en osmolyte seront explicités lorsque les bases moléculaires des interactions protéines-osmolytes seront abordées.

3.2.2 Effets sur le repliement des protéines

Environ 30% des protéines néo-synthétisées adoptent des conformations non natives et sont dégradées par le protéasome peu de temps après avoir été libérées par les ribosomes (62). Une partie de ces protéines mal repliées échappe au protéasome et peut former des agrégats stables. Les osmolytes permettent de prévenir la formation des agrégats protéiques de ce type et il a été récemment démontré que la glycine bêtaïne pouvait même resolubiliser la protéine de fusion GST-GFP après son agrégation (63).

Récemment, il a aussi été démontré que des protéines intrinsèquement instables et non structurées pouvaient adopter une conformation en présence d'osmolytes. Par exemple l' α -synucléine est capable de se structurer en présence de TMAO, alors que cette protéine abondante dans le cerveau a une structure native non repliée *in vitro*. Elle ne possède pas de structure ordonnée *in vitro* à pH neutre (64).

Le tréhalose, contrairement au saccharose, favorise la formation de structures secondaires du domaine d'activation en C-terminal de l'HSF1 (*Heat Shock transcription Factor*) de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce repliement permettrait de maintenir un taux d'activité transcriptionnel élevé en condition de stress continu (65). De même, le TMAO augmente les populations repliées comme l'état natif de longs fragments N-terminaux de nucléase de *Staphylococcus* SNase appelés : SNase 110 (résidus 1-110), SNase 121 (1-121) et SNase 135 (1-135)(66, 67).

L'ajout d'osmolytes *in vitro*, prévient la perte d'activité des enzymes, pour de nombreuses protéines il inhibe l'agrégation irréversible par la résistance à la dénaturation thermique et chimique. De plus, les osmolytes peuvent induire la formation de structures secondaires et localement des structures tertiaires, stabilisant des formes pré-repliées qui permettraient ensuite une accélération du processus de repliement. Cela suggère que les osmolytes, à l'exception de l'urée, ne sont pas seulement des composés du métabolisme, mais exercent également d'importantes fonctions physiologiques *in vivo* en maintenant l'activité enzymatique et en stabilisant les structures des protéines (61).

3.3 Effets sur l'association moléculaire et l'interaction entres partenaires

De la même manière que les osmolytes agissent sur les protéines en modifiant leur stabilité en solution, les solutés peuvent moduler l'affinité des interactions protéine-ligand, protéine-protéine ou protéine-ADN (61). On observe une augmentation de l'affinité qui suit de manière remarquable, la même dépendance avec la concentration en osmolyte que la stabilité et le repliement des protéines, même à faible concentration en osmolytes. On peut trouver de nombreux exemples dans la littérature pour des anticorps se fixant à des antigènes (68), la variation de l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine (69, 70), la fixation de protéines régulatrices à leurs séquences de reconnaissance sur l'ADN (71, 72), la dimérisation de l' α chymotrypsine (73). La ressemblance dans la linéarité de la réponse suggère que les mécanismes impliqués dans la stabilité des protéines et sur la fixation des ligands sont similaires.

3.4 Effets sur la dynamique interne des protéines

La stabilité, la dynamique et l'activité des protéines sont intimement liées. Dès lors, comment les osmolytes augmentent-ils la stabilité des protéines en ayant peu d'effet sur leur activité enzymatique et quel est leur impact sur la dynamique des protéines ? Si l'impact des

osmolytes sur l'activité des enzymes ou la stabilité des protéines a été très étudié, les études sur la dynamique des protéines en présence d'osmolytes sont plus marginales. Les travaux les plus répandus sont des expériences RMN d'échange proton/deutérium (H/D), de relaxation ^{15}N classique, des expériences de diffusion de neutrons et de temps de vie de phosphorescence du tryptophane. Il est difficile de conclure sur l'effet des osmolytes sur la dynamique interne des protéines devant le peu d'étude et la largeur de l'échelle de temps qu'il faudrait couvrir pour avoir une vue d'ensemble. On peut cependant dégager quelques tendances, avec quelques exemples dans la littérature.

La flexibilité de quatre enzymes, l'apoazurine, l'alcool déshydrogénase, la phosphatase alcaline et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase a été étudiée en mesurant le temps de vie de phosphorescence du tryptophane et la vitesse de quenching à l'acrylamide en absence et en présence de 1,8 M en TMAO (74). Pour différentes températures, aucune différence de dynamique conformationnelle, à l'échelle de la milliseconde à la seconde, sur ces quatre enzymes dans leur état natif n'a été observée. Néanmoins, des expériences RMN d'échanges H/D sur la RNase A en présence de saccharose (75), sur le cytochrome c de cheval et l'inhibiteur de chymotrypsine 2 en présence de glycine (76) ont montré un ralentissement de l'échange des protons amides enfouis dans le cœur hydrophobe des protéines, qui s'échangent lentement. En accord avec l'augmentation de stabilité des protéines en présence d'osmolytes, il a donc été proposé que ceux-ci ralentissent la respiration protéique, c'est-à-dire l'échange entre leur forme dépliée et repliée. Il faut cependant être prudent, car le ralentissement de cette dynamique peut être en partie dû à la nature viscosogène de la plupart des osmolytes à de fortes concentrations et non à des propriétés moléculaires particulières (77-79).

L'impact des osmolytes sur la dynamique de protéines a également été exploré à des échelles de temps allant de la picoseconde à la nanoseconde, à l'aide d'expériences RMN de relaxation ^{15}N . L'effet protecteur du TMAO sur la ribonucléase A en présence de chlorure de guanidine a été étudié par ce type d'expériences (80). Une flexibilité accrue de la protéine est observée lors de l'ajout de 0,7 M de chlorure de guanidine. Puis l'addition de 0,35 M de TMAO rigidifie significativement le squelette de la ribonucléase A (ratio 2 :1) avec un retour à la dynamique de la protéine native. Le TMAO a donc un impact sur la dynamique rapide de la ribonucléase lorsque la dynamique est préalablement accrue par un agent dénaturant, en accord avec son pouvoir stabilisant (80).

Je vais maintenant décrire les modèles théoriques les plus courants dans la littérature pour expliquer l'effet des osmolytes sur les protéines.

4. Les bases moléculaires de l'effet des osmolytes sur les protéines

Nous avons précédemment vu que les osmolytes contribuent à maintenir l'homéostasie de la cellule et qu'ils modifient les propriétés des macromolécules en solution. Globalement, ils inhibent peu les enzymes dans des conditions physiologiques et permettent le maintien d'un niveau d'activité enzymatique basal à haute température ou en présence d'un agent dénaturant. Hormis l'urée, ils stabilisent la structure des protéines et semblent rigidifier leur dynamique à l'échelle de la seconde à l'état natif et de la picoseconde-nanoseconde lorsqu'elles sont déstabilisées par un stress chimique. Avec la succession des études impliquant de nombreux couples protéine-osmolyte, différentes théories ont émergé pour expliquer les bases moléculaires de l'effet des osmolytes. Parmi les plus courantes, nous verrons plus particulièrement l'encombrement moléculaire avec la notion de volume d'exclusion (81-83) et l'effet osmophile (84) basé sur le modèle de transfert d'énergie libre de Tanford (85). Je vais tout d'abord décrire le système protéine-eau-osmolyte avant de présenter les principaux modèles.

4.1 La compétition eau-osmolyte à la surface de la protéine

Les petites molécules peuvent interagir avec les macromolécules suivant deux modes d'interaction : la fixation et la solvation. La fixation se traduit par une affinité importante entre molécules qui traduit la spécificité de l'interaction. À l'inverse, le phénomène de solvation implique des interactions très faibles avec des constantes de dissociation K_d des molécules de l'ordre du molaire (par exemple 30 M pour le GdnHCl, (86)).

Les osmolytes ont des affinités très faibles pour les protéines, du même ordre que celle des molécules d'eau (87-89). Dans ce contexte, il est important de considérer les molécules d'eau de manière explicite car elles sont en compétition avec les osmolytes pour interagir avec la surface protéique (90). Je vais commencer par caractériser l'état le plus simple, la protéine dissoute dans l'eau puis le système protéine-osmolyte-eau et introduire les notions de liaison et d'exclusion préférentielle.

4.1.1 L'hydratation des protéines

Lorsqu'une protéine est en solution, sa surface est en contact avec des composants du solvant. Les molécules d'eau peuvent être immobilisées, subir une perturbation transitoire de leurs mouvements ou alors être expulsées de la proximité de la protéine. On peut définir la couche d'hydratation d'une protéine comme la masse d'eau fluctuante, qui se déplace de manière non aléatoire dans la même direction que la protéine dans un processus de transport. Lorsque l'on divise la masse de ce nuage d'eau par la masse moléculaire de l'eau, on obtient le nombre de molécules d'eau d'hydratation W_H d'une protéine. C'est le nombre apparent de molécules d'eau qui interagissent avec la surface protéique. Comme l'hydratation est un phénomène dynamique, le nombre de molécules d'eau participant à l'hydratation d'une protéine ne correspond pas au nombre de molécules nécessaires pour tapisser sa surface. L'hydratation W_H d'une protéine est la somme de toutes les contributions temporelles w_i de chaque molécule d'eau au contact de la protéine $W_H = \sum w_i$. Par exemple, si une molécule est pendant 50% de son temps en contact avec la protéine, elle compte pour 0,5 molécule d'hydratation ($w_i = 0,5$). Il n'existe pas de couche d'hydratation rigide de molécules d'eau autour d'une protéine, l'hydratation est toujours un phénomène dynamique (90).

4.1.2 L'exclusion et la liaison préférentielle des osmolytes

Lorsque l'on ajoute une protéine dans un mélange d'eau et d'osmolytes, il y a une redistribution des molécules d'eau et de soluté à proximité de la protéine. Les proportions relatives de molécules d'eau et d'osmolytes sont en général différentes de celles du reste de la solution. Il peut y avoir un excès d'osmolytes et un déficit d'eau et vice versa. Cet équilibre est régi par l'affinité relative, à la surface protéique, de l'eau ou de l'osmolyte pour la protéine. Cette interaction préférentielle, peut être caractérisée en considérant le couple protéine-osmolyte ou, de manière réciproque, le couple protéine-eau.

Thermodynamiquement le système est décrit par les paramètres de liaison protéine-osmolyte Γ_{PO} et protéine-eau Γ_{PW} , ces grandeurs relatent les perturbations mutuelles des potentiels chimiques des protéines et des osmolytes, et respectivement des protéines et de l'eau. Considérant l'ensemble de la surface de la protéine, si l'osmolyte a une meilleure affinité que l'eau, Γ_{PO} est positive (et $\Gamma_{PW} < 0$) et il y aura un excès d'osmolytes à l'interface protéine-solvant. On parle alors de liaison préférentielle. Si au contraire, l'eau a une meilleure affinité que l'osmolyte pour la surface de la protéine, la constante Γ_{PW} est positive (et $\Gamma_{PO} < 0$). C'est

le phénomène d'hydratation préférentielle ou d'exclusion préférentielle des osmolytes (90, 91).

Les phénomènes d'exclusion et de liaison préférentielle sont symétriques de part et d'autre d'un point de neutralité où la protéine est thermodynamiquement indifférente au contact de l'eau ou de l'osmolyte. La composition du solvant dans cette région de la protéine est équivalente à celle du reste de la solution et dans ce cas l'osmolyte est considéré comme un composé inerte. Ces différentes situations sont résumées sur la Figure 5.

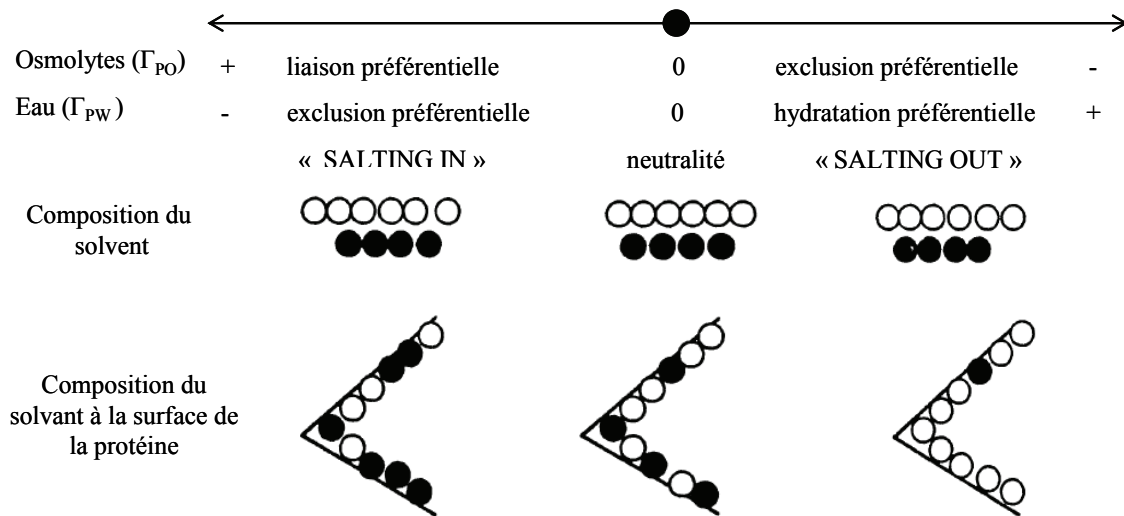


Figure 5: Liaison ou exclusion préférentielle des composés du solvant de la surface protéique. (90)

La plupart des osmolytes, hormis l'urée (glycérol, tréhalose, glycine bêtaïne, sorbitol, etc.) sont préférentiellement exclus de la surface des protéines. Les osmolytes favorisent donc l'hydratation préférentielle. La magnitude de ce phénomène est néanmoins fonction des couples protéine-osmolyte étudiés (90).

4.2 Les mécanismes moléculaires qui modifient les propriétés des protéines

De nombreuses théories et modèles thermodynamiques ont émergé afin de rationaliser et de quantifier les forces responsables du repliement et de la stabilité des protéines. Les propriétés stabilisatrices ou déstabilisatrices des osmolytes ont donc été étudiées en parallèle. De nombreux concepts permettent de décrire les interactions protéine-osmolyte et de prédire, avec une certaine précision, l'effet d'un osmolyte sur une protéine donnée. Nous allons voir

les deux principaux modèles : l'encombrement moléculaire et l'effet osmophile. Il existe d'autres concepts dans la littérature mais qui ont été réfutés ou qui sont basés sur les deux précédents.

4.2.1 Le modèle de l'exclusion de volume et l'encombrement moléculaire

Le modèle d'encombrement moléculaire est principalement basé sur la notion d'exclusion de volume ou d'exclusion stérique. Le volume d'exclusion d'une macromolécule est le volume qui n'est pas accessible pour un soluté en solution. Par définition, c'est la somme du volume de la macromolécule étudiée et du volume interstitiel autour de l'enveloppe protéique, comme schématisé sur la Figure 6. Le volume d'exclusion est donc fonction de la taille de la macromolécule et de la taille de l'osmolyte (92-94). Si on assimile une protéine et un osmolyte à des sphères rigides, on peut calculer le volume d'exclusion avec la relation suivante :

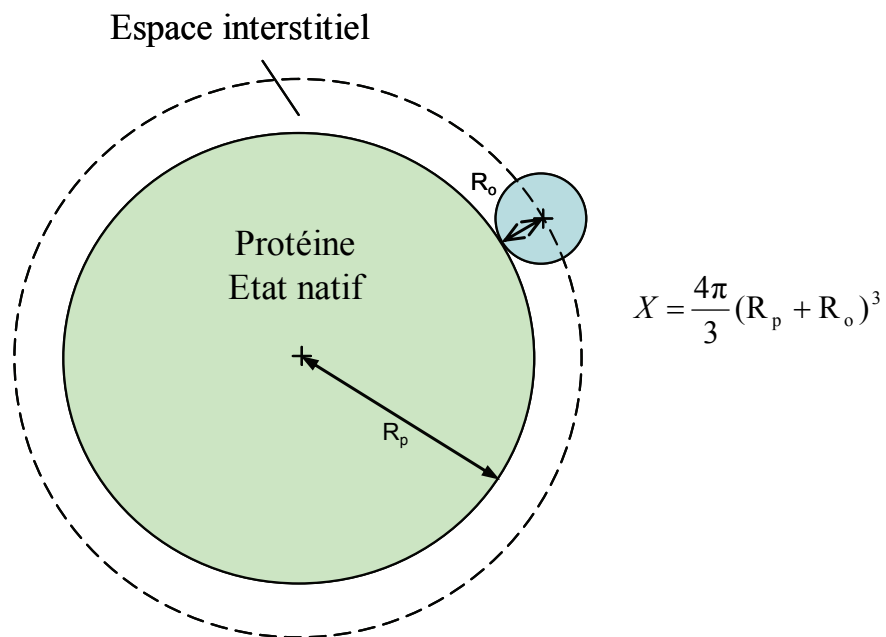


Figure 6 : L'exclusion de volume.

X est le volume d'exclusion, R_p et le rayon de la protéine et R_o le rayon de l'osmolyte.

L'étude de l'encombrement moléculaire d'une macromolécule revient à étudier les effets du volume d'exclusion sur les propriétés énergétiques et la diffusion des macromolécules en solution. Le confinement moléculaire est l'effet du volume d'exclusion sur les propriétés d'une macromolécule située dans un espace très réduit et ne sera pas abordé dans la thèse. Il

est possible de prédire qualitativement (et parfois quantitativement) l'effet de l'exclusion de volume en utilisant des modèles thermodynamiques simples et de mesurer expérimentalement l'effet de l'encombrement moléculaire sur les réactions biochimiques. Pour cela on considère toutes les molécules du système comme des sphères rigides et inertes, on ignore donc les contacts protéine-osmolytes ou protéine-eau. Pour obtenir des données expérimentales sur l'effet de l'encombrement moléculaire sur les protéines, de nombreux groupes étudient les propriétés des protéines en présence de polymères de différentes tailles (polyéthylène glycol, dextrane, Ficoll, etc.) (81). On peut considérer les osmolytes comme des agents encombrants et s'appuyer sur cette théorie pour expliquer l'effet des osmolytes sur les protéines. L'hypothèse initiale de l'encombrement moléculaire est que lorsqu'un système est en équilibre entre deux états, celui où le volume d'exclusion est le plus faible, est favorable thermodynamiquement (81).

4.2.2 L'impact de l'encombrement moléculaire sur les propriétés des macromolécules

D'après ce modèle, l'encombrement des macromolécules a un impact sur l'association protéine-protéine, protéine-ligand et le repliement des protéines. Si on considère deux protéines A et B qui interagissent, l'encombrement moléculaire va favoriser la formation du complexe AB si le volume exclu du complexe est inférieur à la somme des volumes exclus des protéines A et B. Dans le cas contraire, l'association sera inhibée comme on le voit sur la Figure 7. Généralement dans la cellule, les complexes protéiques sont hautement ordonnés, aussi l'encombrement moléculaire favorise les interactions et stabilise d'autant plus les oligomérisations que les complexes formés sont compacts. À l'inverse, ce modèle permet d'expliquer pourquoi les agrégats non ordonnés de protéines sont défavorisés par la présence de solutés. La fixation d'un ligand sur une protéine est encore plus favorisée par l'encombrement moléculaire que les interactions protéine-protéine (Figure 7).

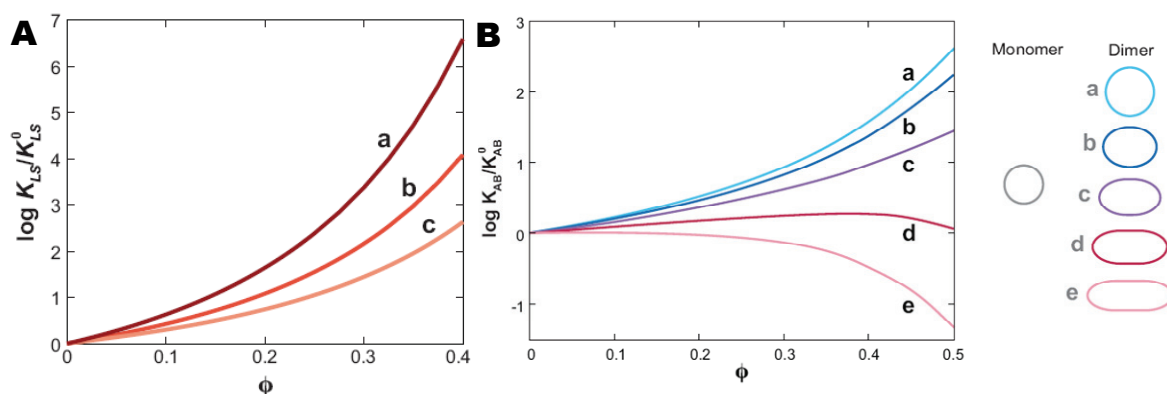


Figure 7 : (A) Constante d'équilibre d'association d'un ligand supposé sphérique sur un site de fixation d'une protéine en fonction de la fraction volumique ϕ en soluté. Trois taux $M(\text{soluté})/M(\text{ligand})$ ont été étudiés; a) 2, b) 1, c) 0,5. (B) Constante d'équilibre d'association de deux partenaires sphériques A et B pour former un complexe AB en fonction de la topologie du complexe formé et de la fraction volumique ϕ en soluté. (81)

La présence de molécules qui encombrent le milieu influence l'équilibre entre les états conformationnels des protéines en favorisant les conformations qui excluent le moins de volume à la molécule de soluté. Ainsi, l'encombrement moléculaire favorise l'état natif des protéines qui est plus compact que son état déplié. Plus la différence de volume d'exclusion ΔX est grande et plus l'énergie à fournir pour déplier la protéine est importante. Par conséquent, la variation du volume d'exclusion, stabilise les protéines en favorisant leurs conformations natives. Ceci implique également que plus l'osmolyte est de grande taille, plus le volume exclu est important et plus la protéine sera stabilisée par ce soluté. Cependant, l'hypothèse à laquelle conduit ce modèle pose problème puisque cela suggère que tous les solutés de taille supérieure à l'eau induisent la stabilisation des macromolécules. Or il est connu depuis 1931, que l'urée déstabilise les protéines à cause de ses interactions favorables avec les groupements chimiques enfouis au cœur des protéines dans leurs formes natives mais accessibles à l'urée dans leurs formes dépliées (95). Le concept de l'encombrement moléculaire permet de manière simple et efficace d'expliquer globalement le comportement des macromolécules en présence d'osmolytes (81, 82). Il est cependant incomplet pour expliquer comment les osmolytes stabilisent les protéines puisqu'il néglige les contacts moléculaires.

4.2.3 La balance entre l'exclusion de volume et les interactions moléculaires

Comme on l'a vu précédemment, en général, les osmolytes, hormis l'urée, stabilisent les structures compactes des protéines qui induisent une exclusion de volume minimale.

Cependant les interactions favorables des osmolytes avec les chaînes latérales des résidus déstabilisent la conformation native des protéines comme dans le cas de l'urée (85, 96). Par conséquent la stabilité d'une protéine, à l'état natif en présence d'osmolytes, dépend de la différence entre les effets de la variation du volume exclu ΔX et des interactions protéine-soluté $\sum K$. Si $\sum K > \Delta X$ alors l'état le plus stable pour la protéine sera sa forme dépliée, c'est le cas en présence d'urée ou de chlorure de guanidine. Pour tous les autres osmolytes, $\sum K < \Delta X$ et la stabilité des protéines augmente avec la présence d'osmolytes (93, 97).

Par conséquent, prenant à la fois en compte l'exclusion de volume et les interactions moléculaires, il est possible d'expliquer la stabilité des protéines en présence de solutés. Nous allons voir maintenant une autre théorie se basant cette fois-ci, sur la nature des interactions protéine-osmolyte qui permet d'expliquer (et parfois de quantifier), les processus de repliement et de stabilisation des protéines.

4.2.4 L'effet osmophile ou solvophile

Les principales interactions responsables du repliement et de la stabilité des protéines en solution ont été décrites par Kauzmann, il y a 50 ans (98). Il s'agit des forces électrostatiques, des forces de Van der Waals, des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes. Partant du constat que la majorité des osmolytes sont préférentiellement exclus de la surface protéique, il a été proposé, il y a une dizaine d'années, une nouvelle interaction favorisant le repliement des protéines : l'effet osmophile ou solvophile (94, 99, 100). Cette force est basée sur l'interaction défavorable des osmolytes avec le squelette peptidique des protéines qui favorisent le repliement des protéines.

Le squelette peptidique d'une protéine non repliée est fortement exposé au solvant par rapport à une protéine repliée dans une conformation native. L'ajout d'osmolytes induit une augmentation de l'énergie libre de la forme dépliée, qui devient supérieure à l'énergie libre de la protéine repliée. Par conséquent, les protéines non structurées dans l'eau vont avoir tendance à se replier spontanément lors de l'ajout d'osmolytes. Pour une protéine dans une conformation native dans l'eau, l'ajout d'osmolytes va amplifier la différence d'énergie libre entre l'état natif et l'état déplié et stabiliser l'état replié de la protéine.

Néanmoins, les osmolytes interagissent favorablement avec les chaînes latérales de certains acides aminés. Ces interactions sont relativement faibles et ne sont généralement pas suffisantes pour contrebalancer l'effet osmophile et empêcher le repliement de la protéine. Cette interaction des osmolytes avec les chaînes latérales des acides aminés à la surface de la protéine, opposée à l'effet osmophile, peut expliquer la variabilité des effets stabilisateurs des solutés suivant les couples protéine-osmolyte. Ainsi, des études montrent que si toutes les familles d'osmolytes ont le même mode d'action, la force de l'effet osmophile pour une protéine donnée varie en fonction de la nature de l'osmolyte. Par exemple, le TMAO a l'effet stabilisant le plus fort sur la RNase T₁ devant la sarcosine, le saccharose et la proline comme on peut le voir sur la Figure 8.

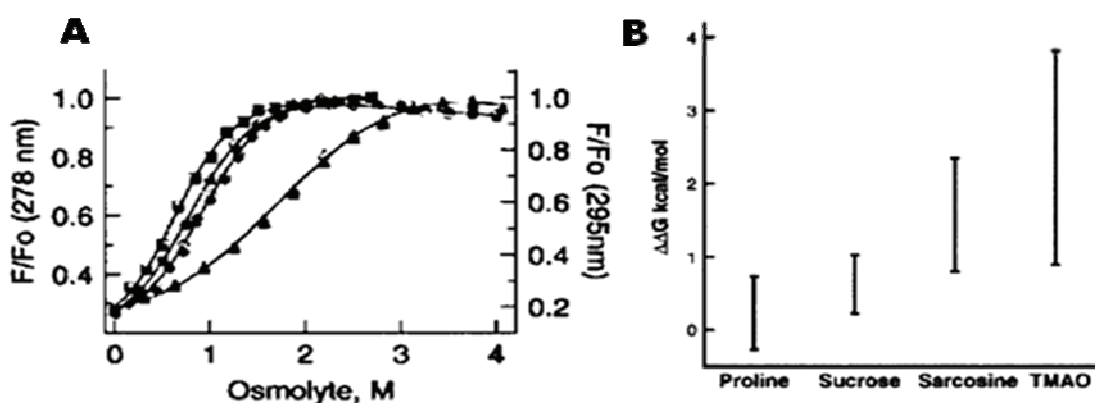


Figure 8 : (A) Repliement de la RNase T₁ CAM avec l'ajout de différents osmolytes; carrés: TMAO, cercles : sarcosine, diamants : saccharose, triangles : proline. (B) Augmentation de la stabilité de RNase T₁ CAM en présence de différents osmolytes (1 M). (84)

L'effet osmophile est une interaction d'importance biologique dans le repliement des protéines, distincte et complémentaire des forces de repliement décrites par Kauzmann (101).

J'ai exposé les deux approches théoriques les plus développées dans la littérature qui décrivent le mieux l'impact des osmolytes observé expérimentalement sur les protéines. Un dernier concept a trouvé quelques échos mais a été fortement critiqué de par sa simplicité et semble aujourd'hui invalidé expérimentalement. L'idée principale est que les solutés stabilisateurs ou déstabilisateurs des protéines agissent indirectement en influençant la structure de l'eau. L'eau peut être conceptualisée comme un mélange de deux espèces qui s'échangent en solution : des molécules d'eau forment un réseau dense et d'autres formant un ensemble plus libre. Ainsi, il a été proposé que les cosolvants qui structurent les molécules d'eau stabilisent les protéines et vice versa. Il a cependant été démontré empiriquement qu'il n'y avait pas de lien entre les propriétés structurantes des solutés et la stabilité des protéines.

Si l'effet de la structure de l'eau existe, il n'est donc pas déterminant dans l'effet des osmolytes sur la stabilité des protéines (102).

4.2.5 Synthèse

Au final, l'effet global des osmolytes sur les propriétés des protéines est probablement la résultante des effets de l'exclusion de volume, des interactions des osmolytes avec les chaînes latérales des acides aminés et de l'effet osmophile. De nombreuses expériences sur la stabilité et le repliement de nombreuses protéines en présence d'osmolytes permettent aujourd'hui de proposer des modèles pour quantifier l'impact de ces effets et de prédire partiellement le comportement d'une protéine dans un soluté donné. Le nombre de données sur l'étude de la dynamique interne des protéines en présence d'osmolyte est encore limité, néanmoins on observe globalement un ralentissement de la respiration protéique. L'activité d'une protéine est fonction de nombreux paramètres liés à la nature de la réaction catalysée, aux propriétés de l'enzyme (stabilité, dynamique) et du milieu (diffusion des molécules, interactions, etc.). Il est donc très difficile de proposer une règle générale pour prédire l'activité enzymatique en fonction de concentration en osmolytes. Cependant, il est probable comme le montre la théorie de l'encombrement moléculaire que la diffusion des molécules joue un rôle significatif. Il sera très intéressant de confronter nos résultats sur la DHFR avec ces modèles théoriques.

5. Le phénomène osmotique à l'échelle macromoléculaire

Avant de caractériser la DHFR qui est notre enzyme modèle pour étudier l'effet des osmolytes, je vais traiter succinctement la théorie du « stress osmotique » (103, 104) utilisée pour dénombrer les molécules d'eau. Ces études sont particulièrement intéressantes de par le débat scientifique intense qu'elles ont engendrées.

5.1 La contrainte osmotique pour les macromolécules

Même à l'échelle du nanomètre, il y a souvent des restrictions de volume où les solutés ne peuvent entrer. Il y a des espaces entre, dans et autour des macromolécules qui vont exclure les solutés de différentes tailles comme par exemple dans le cas de canaux, de cavités à la surface ou de réseaux moléculaires comme on peut le voir sur la Figure 9.

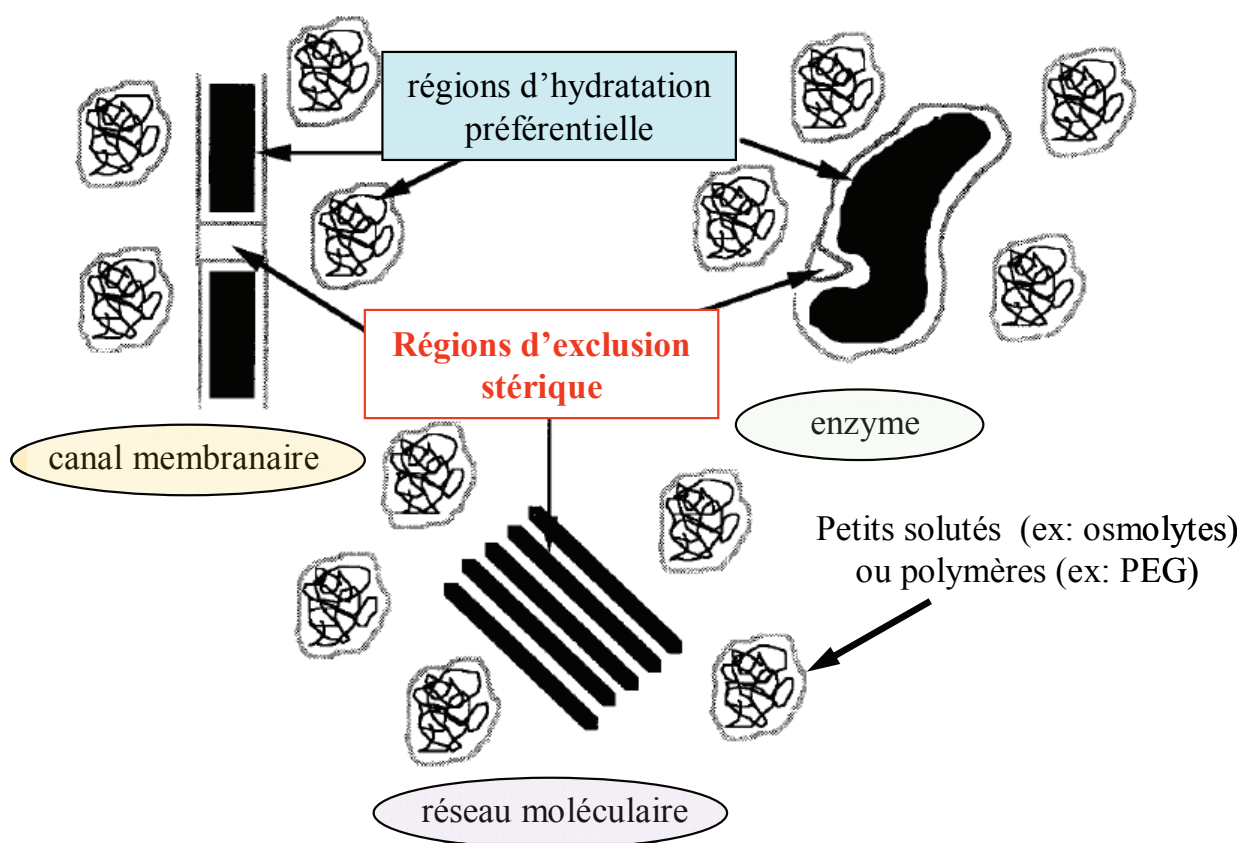


Figure 9 : Exemples de volumes non accessibles à des solutés dans la cellule. (105)

Ces solutés exclus vont créer une pression qui va extraire les molécules d'eau de ces espaces, induisant des modifications des propriétés des macromolécules et des composants cellulaires. La réponse de la cellule au stress osmotique *via* l'accumulation de soluté va donc avoir des effets sur la conformation et l'état des macromolécules (104).

Par exemple, l'alaméthicine est un peptide qui s'assemble en hexamère pour former des canaux ioniques voltage-dépendant. L'addition de polyéthylène glycol (PEG) à une solution contenant une bicouche lipidique avec des canaux d'alaméthicine supprime l'ouverture de ces canaux. La réduction de la probabilité d'ouverture de canaux a été observée pour différents types de canaux membranaires. Un canal peut être sous deux états de conductance différents, une forme « ouverte » et une forme « fermée ». La forme ouverte par définition a un volume d'eau d'hydratation préférentielle plus élevée que la forme « fermée ». Or l'exclusion des molécules de soluté hors du canal induit une pression osmotique qui va à l'encontre de l'hydratation du canal lors de sa transition à l'état ouvert. Par conséquent l'état fermé est favorisé (106, 107).

Le « stress osmotique » peut avoir un impact sur l'activité et l'équilibre conformationnel des enzymes. Si la conformation de l'enzyme varie lors de son cycle catalytique, la présence d'osmolytes va favoriser la conformation la moins hydratée, mais cet effet ne se répercute pas toujours sur la vitesse de catalyse de l'enzyme (108). De plus, dans certaines réactions biochimiques, l'eau participe à la réaction en tant que réactif (par exemple pour les transferts d'hydrure) et la baisse de l'activité de l'eau peut avoir un impact sur ce type de réaction (109). L'exemple de l'hémoglobine montre l'influence de la pression osmotique sur l'allostérie d'une enzyme. La fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine induit une modification structurale de la forme non oxygénée, la forme T (tendue), vers l'état R (relaxée) complètement oxygénée où quatre molécules d'oxygène sont liées. En absence d'oxygène, la forme T est la plus stable. La transition vers la forme R est coopérative avec l'augmentation de la pression partielle en oxygène. L'hémoglobine est composée de quatre monomères et le passage de la forme T à la forme R s'accompagne de réarrangements structuraux qui nécessitent des molécules d'eau. Lorsque l'hémoglobine est placée en présence de solutés son affinité pour l'oxygène décroît peu importe le type de soluté utilisé (saccharose, glucose, glycine, PEG). La baisse de l'activité de l'eau favorise la forme T qui est moins hydratée (69).

5.2 Les osmolytes comme outils pour étudier les propriétés des protéines

La stratégie du « stress osmotique » consiste à moduler intentionnellement l'activité de l'eau pour estimer les forces entre molécules ou mesurer des modifications de l'hydratation qui ont lieu lors de l'activité d'une protéine (103). Il a été possible grâce à cette méthode de constater l'influence de l'activité de l'eau lors de réactions macromoléculaires ou de transitions conformationnelles. Cette méthode a largement été utilisée pour dénombrer les molécules d'eau impliquées dans divers processus biologiques ou le nombre de molécules à la surface des protéines.

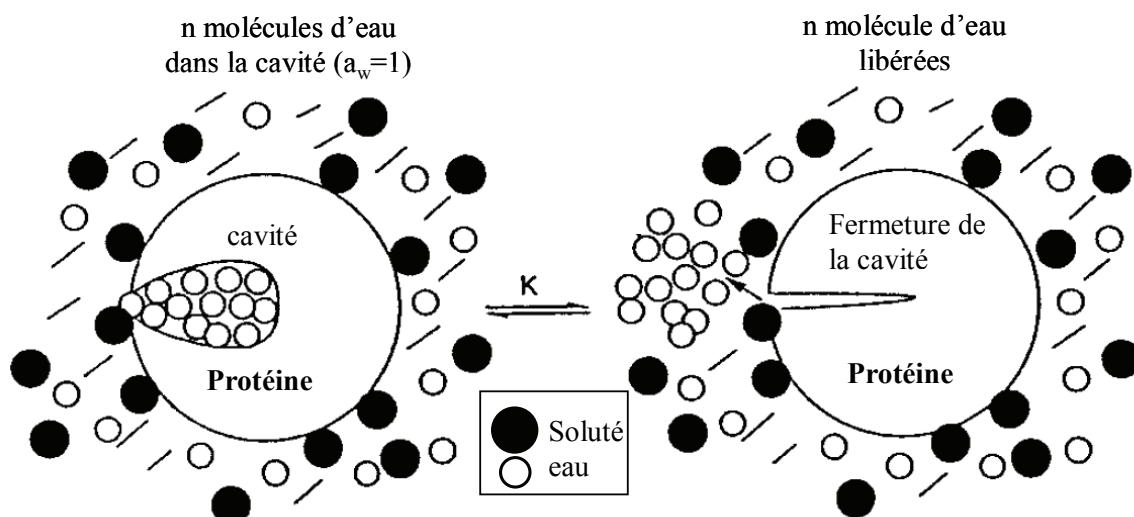


Figure 10 : Libération des molécules d'eau séquestrées dans une cavité protéique inaccessible aux molécules de solutés. L'activité de l'eau dans la cavité est supérieure à l'activité de l'eau dans le milieu. (110)

Cependant la validité de la méthode du « stress osmotique » malgré sa popularité, est sujette à polémique et certaines incohérences ont été pointées (91, 111). Tout d'abord, cette théorie considère que les osmolytes sont inertes alors qu'ils sont exclus de la surface protéique. Le nombre de molécules d'eau à la surface d'une protéine en appliquant le stress osmotique varie avec le type d'osmolyte utilisé. La RNase A possède 130, 170, 350 et 400 molécules d'eau si on utilise respectivement comme soluté, le glucose (112), le lactose (112), le saccharose (113) ou le tréhalose (114). Cette méthode surestime le nombre de molécules d'eau impliquées, car l'effet dû à l'exclusion des osmolytes ou à l'hydratation préférentielle n'est pas négligeable, et plusieurs couches d'eau peuvent être affectées. Par exemple, lors de la libération du glucose de l'hexokinase, 326 molécules d'eau sont adsorbées si on utilise le « stress osmotique » contre 33 si on utilise une méthode volumétrique (115). L'analyse par le stress osmotique ne donne accès qu'à l'hydratation préférentielle dépendante de l'osmolyte utilisé et non à l'eau d'hydratation de la protéine (90). Le seul cas où l'on pourrait mesurer avec la méthode du stress osmotique le nombre de molécules d'eau impliquées dans une réaction serait représenté par la Figure 10, où un nombre n molécules d'eau sont séquestrées dans une cavité. Si n est déterminé de manière expérimentale est identique pour plusieurs osmolytes alors il probable que ce soit bien le nombre de molécules effectivement présentes dans la cavité. Cependant de tels résultats dans ce type d'étude n'ont pas encore été observés. D'autres techniques, comme la diffraction et diffusion de la lumière, des Rayons X et des neutrons aux petits angles (LS, SAXS et SANS) permettent d'étudier la solvation des

macromolécules (116), les modifications des propriétés des protéines en fonction de la composition du milieu *in vivo* et *in vitro* (87, 92).

Au cours de cette thèse, j'ai utilisé diverses méthodes biophysiques, afin de mieux comprendre l'impact des osmolytes sur les protéines, nous avons choisi d'étudier la dihydrofolate réductase d' *E. coli* (DHFR).

6. Notre modèle d'étude : la DHFR d'*E. coli*

La dihydrofolate réductase (DHFR, EC 1.5.1.3) est une enzyme ubiquitaire que l'on trouve chez tous les organismes. Elle a été découverte à la fin des années 1950, et 60 ans plus tard, elle est encore étudiée de manière intensive par les scientifiques dans différentes disciplines. Georges H. Hitchings a reçu le prix Nobel de médecine en 1988 pour ses travaux sur la chimiothérapie anticancéreuse (117). Il a travaillé sur la découverte de molécules anti-folate dirigées contre les tumeurs, les bactéries pathogènes et les parasites de la malaria. Ces molécules actives dont le méthotrexate (MTX), un agent anticancéreux encore utilisé aujourd'hui, sont des inhibiteurs de la DHFR. Cette enzyme a d'ailleurs été découverte au terme d'efforts importants pour déterminer la cible du MTX. Hitchings et son équipe ont ensuite étudié les éléments structuraux responsables de la forte affinité du MTX pour la DHFR ainsi que la proportion d'enzyme responsable de la résistance aux inhibiteurs. Ces découvertes ont permis de développer de nouvelles stratégies anticancéreuses et de mettre en évidence le rôle central de la DHFR dans le métabolisme de la cellule (118). Ceci explique que la DHFR soit une cible thérapeutique dans de nombreuses pathologies. Les études sur la DHFR ont donc principalement été stimulées par la course à la découverte de nouvelles molécules actives (119, 120).

Nous allons voir dans un premier temps la place de la DHFR dans le métabolisme cellulaire, les pathologies associées, ainsi que les inhibiteurs les plus utilisés. Je comparerai ensuite les séquences et structures de DHFR de diverses espèces pour me recentrer enfin sur la DHFR de la bactérie *E. coli*. Je présenterai les différentes conformations et les variations de dynamiques de la DHFR au cours de son cycle catalytique.

6.1 Métabolisme et stratégies thérapeutiques chez l'Homme

La DHFR catalyse la réduction du 7,8-dihydrofolate (DHF) en 5,6,7,8-tetrahydrofolate (THF) par un transfert d'hydrure stéréospécifique du cofacteur NADPH vers l'atome C6 du

cycle ptérine du dihydrofolate (DHF) avec une protonation concomitante de N5 (121). Chez beaucoup d'organismes, la réduction du folate (sur le C7 et le N8 du cycle ptérine) en DHF est aussi catalysée bien que moins efficace (~100 fois moins rapide). Les ligands et la réaction catalysée par la DHFR sont représentés Figure 11.

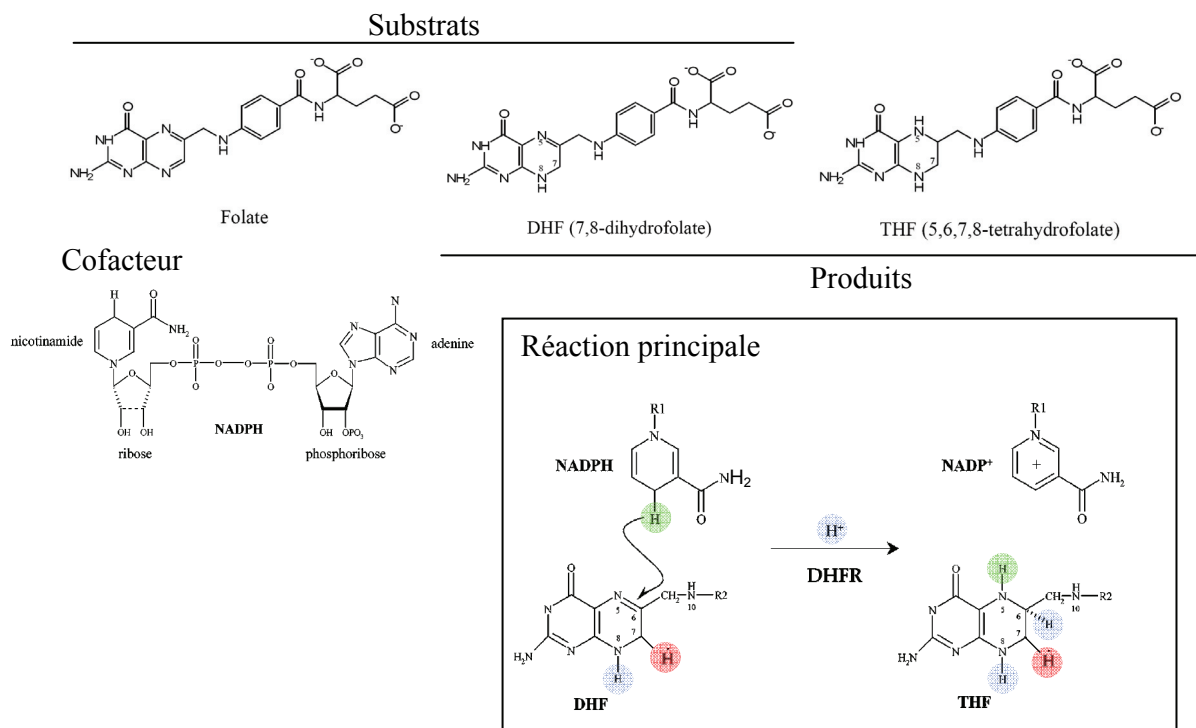


Figure 11 : La réaction catalysée par la DHFR.

La DHFR est indispensable au maintien du pool cellulaire de THF qui est nécessaire à la biosynthèse des purines, du thymidylate, et certains acides aminés. Elle est essentielle pour la croissance et la prolifération cellulaire et est donc la cible de nombreuses molécules anticancéreuses (agents cytostatiques) et antibiotiques (118, 122).

6.1.1 Vue d'ensemble de la voie du folate

L'acide folique ou folate est une vitamine B soluble que l'Homme ne peut pas synthétiser, par conséquent son apport dépend des vitamines contenues dans l'alimentation. Il est présent sous forme de 5-méthyltetrahydrofolate (*N*⁵-methyl-THF) et de 5-formyltetrahydrofolate (*N*⁵-formyl-THF).

Le folate (FA) est un coenzyme impliqué dans une vingtaine de réactions enzymatiques du métabolisme des mammifères. Toutes ces réactions sont interconnectées. Le folate est réduit en dihydrofolate (DHF) puis en tétrahydrofolate (THF). Ce THF est ensuite utilisé pour la synthèse du *N*⁵,*N*¹⁰-méthylène-THF, lui-même cofacteur de la thymidylate synthase (TMS)

qui catalyse la synthèse de déoxythymidine monophosphate (dTMP) à partir du déoxyuridyl-monophosphate (dUMP). Le dTMP est ensuite converti en déoxythymidine trisphosphate (dTTP) pour être utilisé dans la synthèse de l'ADN lors de la réplication (Figure 12) (123, 124).

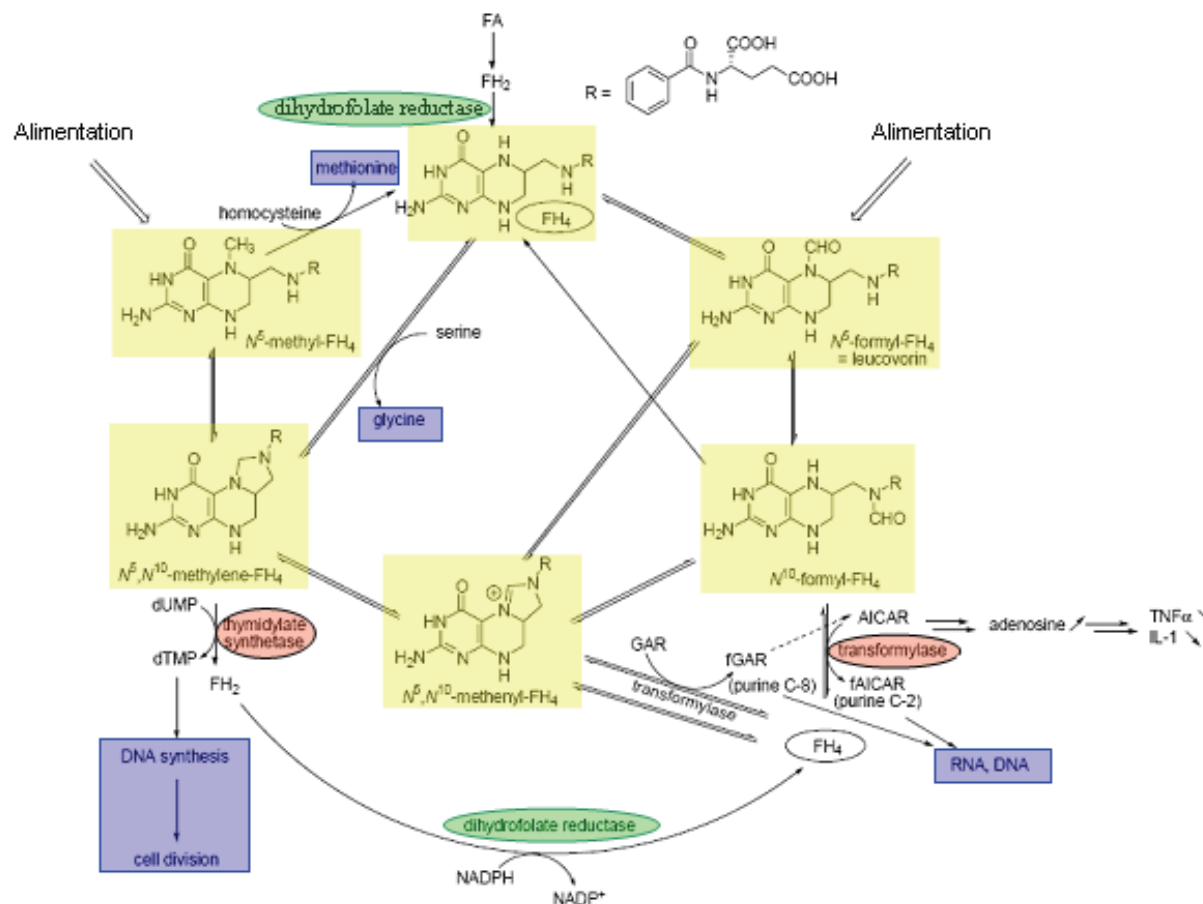


Figure 12: La voie du folate. (FH₂ ou DHF et FH₄ ou THF)

On remarque dans ces voies métaboliques que la DHFR (en vert sur la Figure 12) intervient en amont pour produire du THF à partir du DHF provenant de l'acide folique mais aussi pour recycler le DHF produit par la réduction de dUMP en dTMP par la thymidylate synthétase.

6.1.2 Inhibiteurs de la DHFR et pathologies

Le MTX est encore la molécule thérapeutique la plus utilisée dans les traitements des cancers, leucémies et des lymphomes. Il est également indiqué contre les maladies inflammatoires de Bowel, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et l'asthme (125).

De plus, les différences entre les DHFR de diverses espèces ont été utilisées pour créer des composés sélectifs, létaux pour les bactéries mais relativement inoffensif pour les mammifères (120). Par exemple, le trimethoprim (TMP) est agent anti-bactérien qui se fixe sur les DHFR bactériennes avec une affinité 10^5 fois plus forte que sur les DHFR des vertébrés. L'agent antimalarial pyrimethamine (PTM) qui cible la DHFR de *Plasmodium falciparum*, est utilisé pour ses propriétés contre les protozoaires. Une nouvelle génération d'inhibiteurs lipophiles comme le trimetrexate (TMQ) et le pirimetrexim (PTX) ont des activités anti-néoplasique et anti-protozoaire (Figure 13). De nombreuses autres molécules sont en cours de développement (124).

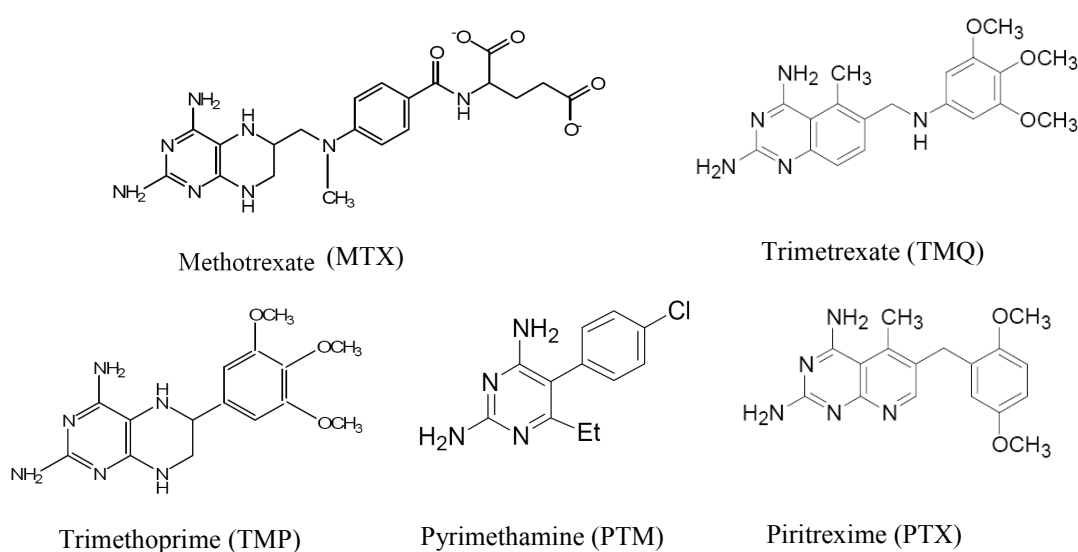


Figure 13 : Les molécules actives les plus utilisées.

6.2 Séquences et structures des DHFR de différentes espèces

Les DHFR isolées à partir de différentes espèces sont relativement petites (18-25 kDa). La première structure déterminée a été celle de la DHFR de *L. casei* en complexe avec le MTX en 1979 (126). Il y a actuellement 117 structures de DHFR déposées dans la Brookhaven Protein Data Bank² (PDB), appartenant à de nombreuses espèces eucaryotes et procaryotes dont *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Thermotoga maritima*, *Candida albicans*, *Haloferax volcanii*, la DHFR humaine etc., complexées avec différents types de ligands (cofacteurs, produits,

² <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

substrats, analogues et inhibiteurs). Il y a par exemple plus de 40 structures de complexes de la DHFR d'*E. coli*.

L'alignement de séquences d'acides aminés de différentes espèces met en évidence des séries de résidus strictement conservés dont la plupart jouent un rôle important dans la catalyse. Ils sont impliqués dans la fixation du substrat ou du coenzyme. Il est surprenant de constater que l'identité de séquence entre les DHFR de différentes espèces est relativement faible (moins de 30%), alors que les structures sont très similaires (Figure 14 et Figure 15) (125).

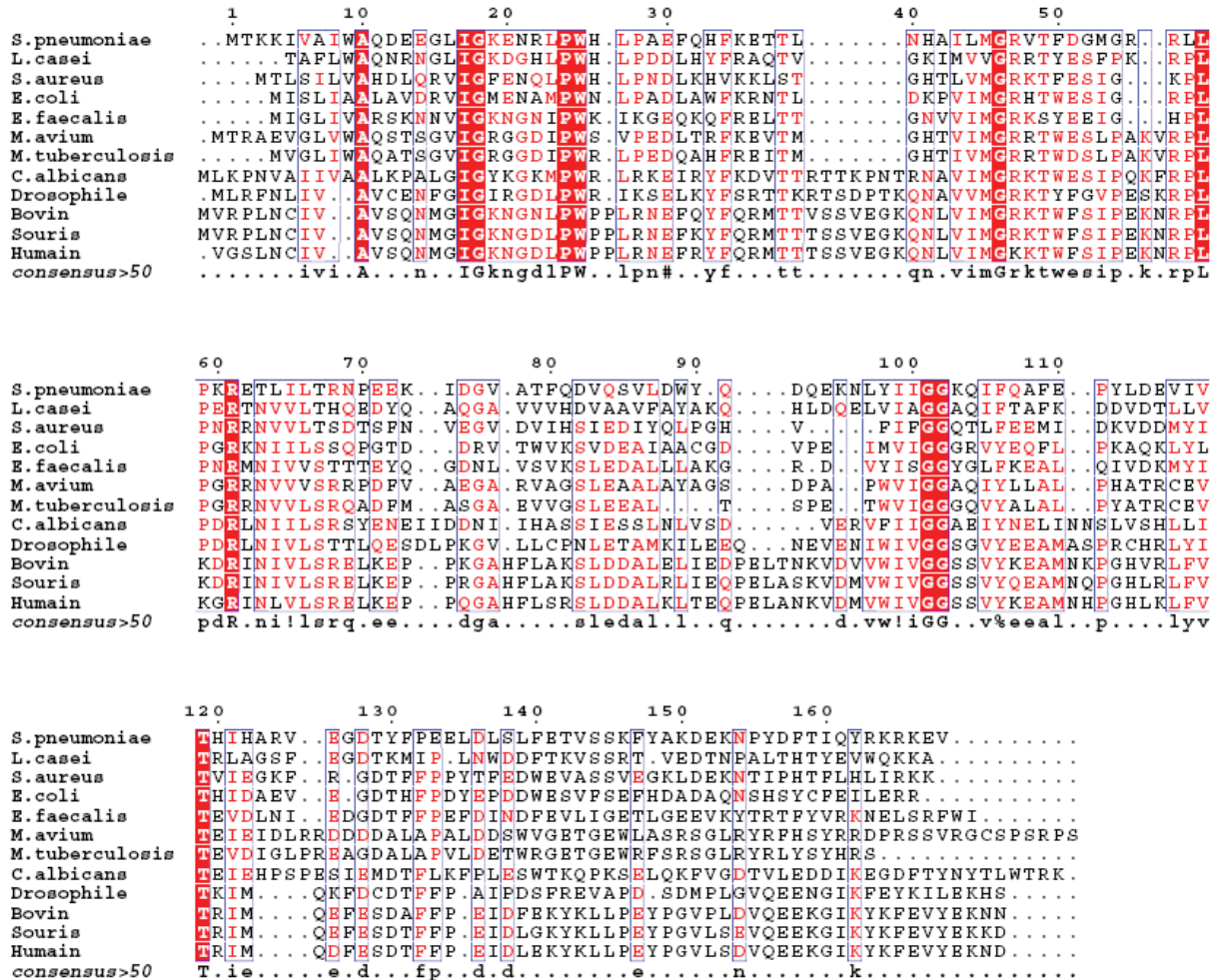


Figure 14 : Alignement de séquences de DHFR de différentes espèces procaryotes et eucaryotes. Les résidus surlignés en rouge sont conservés, les résidus encadrés en bleu sont fortement conservés. On remarque les résidus conservés chez toutes les espèces :

La DHFR a une structure α/β (repliement de type Rosmann) possédant un feuillet β central composé de 8 brins β , et en général au moins 4 hélices α : une qui forme le site de fixation du substrat et deux autres, le site de fixation du coenzyme. Des éléments structuraux sont communs à toutes les formes d'enzymes. La boucle I localisée entre le brin β a et l'hélice α B et une liaison peptidique *cis* entre deux glycines conservées (Gly95 et Gly96 pour *E. coli*).

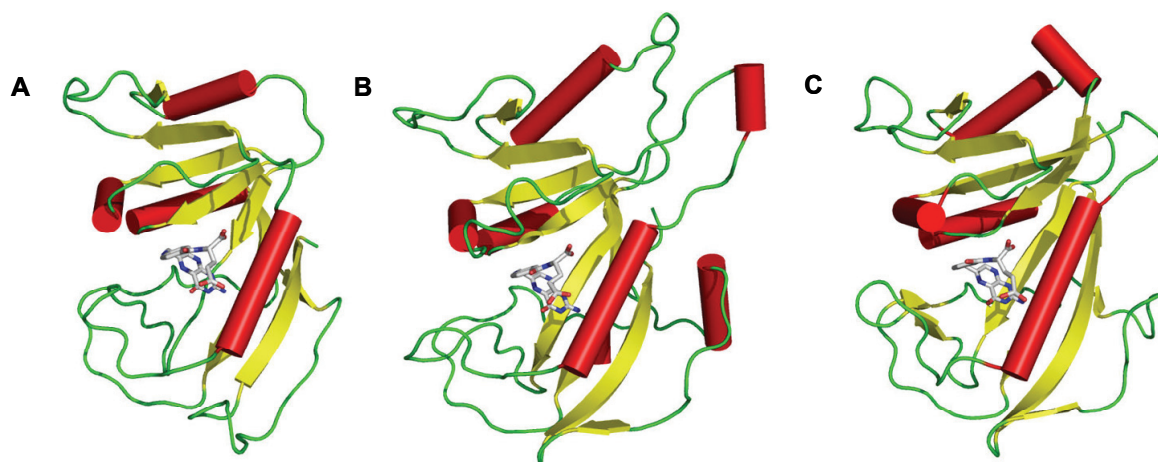


Figure 15 : Représentations schématiques de DHFR en complexe avec le folate de trois espèces différentes A) *Escherichia coli* (1RX7), B) *Pneumocystis carinii* (4CD2) et C) l'Homme (1DRF). Les hélices α sont représentées par des cylindres rouges, les brins β par des flèches jaunes, le folate est en « stick » blanc.

De par sa taille réduite, son rendement de production appréciable et sa stabilité relativement importante, de nombreuses études structurales et mécanistiques ont été menées sur la DHFR de différentes espèces : résolutions structurales, études de cinétiques, calculs théoriques, etc. (127). Le grand nombre d'informations sur la DHFR d'*E. coli* en fait un système modèle. A partir de maintenant, l'abréviation de DHFR dans le manuscrit sous-entendra la DHFR d'*E. coli*.

6.3 La DHFR d'*E. coli*

6.3.1 Structure globale

La DHFR est une protéine de 18 kDa (128) qui possède un feuillet composé de 8 brins β et 4 hélices α . Le site actif forme une crevasse qui divise la protéine en deux sous-domaines structuraux : le sous domaine de fixation de l'adénosine (*Adenosine Binding Domain* ou ABD) et le sous domaine majeur. L'ABD (résidus 38-88), le plus petit des deux sous domaines, est le site de fixation de la partie adénosine du cofacteur. Le sous domaine majeur est constitué d'environ 100 résidus, il est majoritairement constitué de 3 boucles à proximité du site de fixation du ligand. Ces boucles constituent environ 30 à 40% du sous domaine majeur, il est par conséquent parfois appelé le sous-domaine des boucles (*loop subdomain*). Les boucles M20 (résidus 9-24), F-G (résidus 116-132), et G-H (résidus 142-150) ont un rôle primordial lors du cycle catalytique de la DHFR durant lequel l'enzyme adopte deux conformations : *closed* et *occluded*. Ces deux complexes (présentés sur la Figure 16), diffèrent

uniquement par la position de leur boucle M20. Les mouvements de charnière autour de Lys38 et Val88 permettent à l'ABD de bouger sur le domaine majeur une fois que les divers ligands se sont fixés, résultant en la fermeture du site actif (129-131).

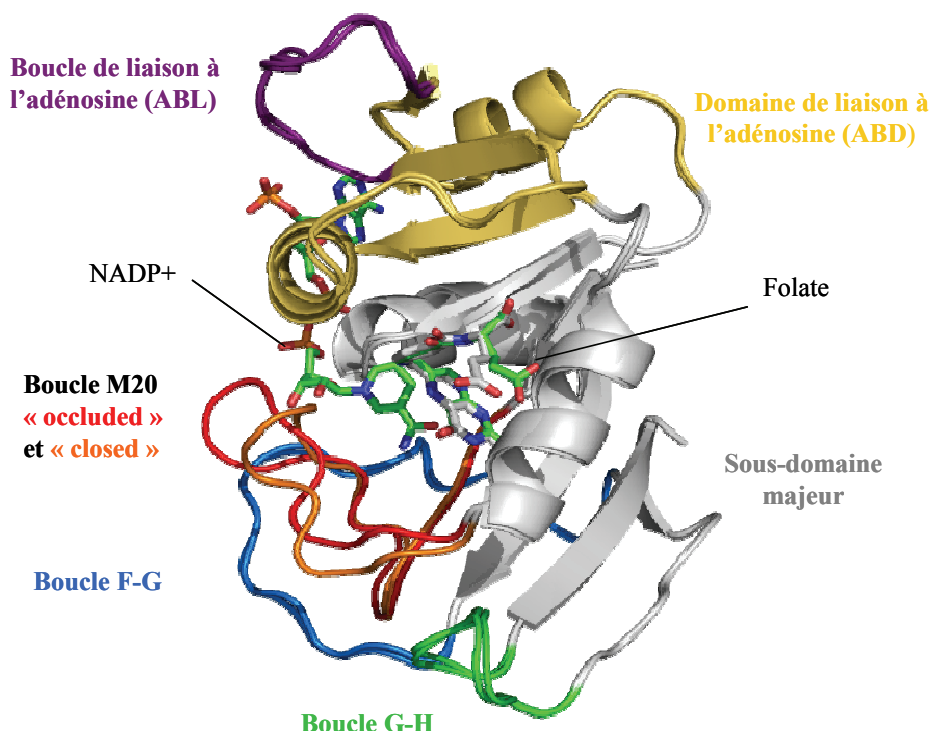


Figure 16 : Superposition des structures des deux complexes de la DHFR: le complexe binaire DHFR:folate (*occluded*) et le complexe ternaire DHFR:folate:NADP⁺ (*closed*).

6.3.2 Mécanisme cinétique

Le schéma catalytique de la DHFR comprend cinq intermédiaires cinétiques observables lors du cycle catalytique : les complexes avec le produit, E:THF:NADP⁺, E:THF et E:THF:NADPH; l'holoenzyme E:NADPH, et le complexe de Michaelis E:DHF:NADPH (132) (Figure 17). Un aspect important du cycle catalytique est que l'étape chimique de transfert d'hydrure, n'est pas suivie immédiatement par la libération du THF. Il y a d'abord libération du cofacteur oxydé (NADP⁺) et fixation d'une nouvelle molécule de NADPH. Ainsi, dans la cellule, l'enzyme *in vivo* n'est jamais sous forme *apo*. Même si le DHF est absent, la DHFR est complexée par le NADPH et est prête pour un nouveau cycle catalytique. Les phases de fixation et de libération des ligands sont coordonnées par une interaction synergique entre les sites de fixation du substrat et du cofacteur. La vitesse de sortie du NADP⁺ est élevée en présence de THF lié et la vitesse de sortie du produit est élevée en

présence de cofacteur réduit. L'étape limitante dans ce cycle catalytique est la libération du THF avec une constante cinétique de dissociation de $12,5 \text{ s}^{-1}$ en présence d'un excès de NADPH (132).

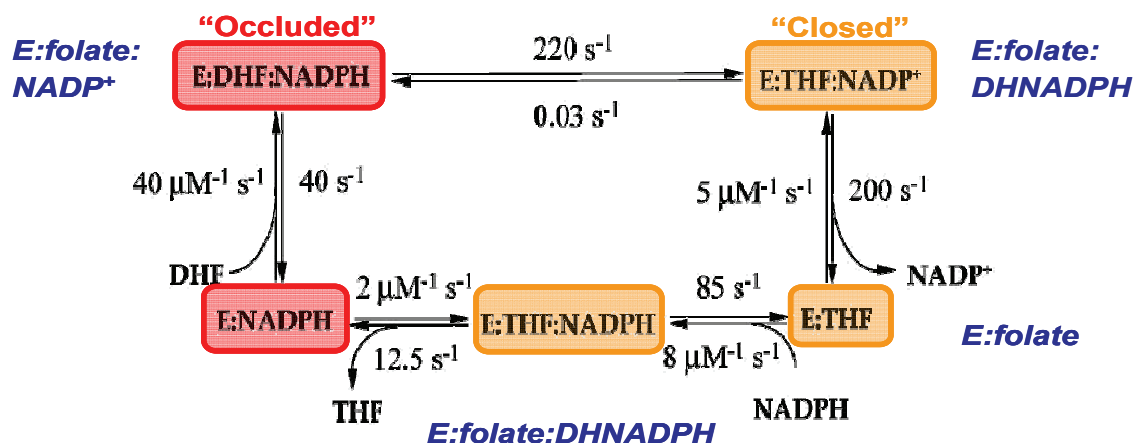


Figure 17 : Cycle catalytique de la DHFR.

La biosynthèse du THF nécessite une double réduction du DHF, deux hypothèses sont proposées pour la provenance du second hydrure qui vient réduire le DHFR en position N5 du cycle ptérine. Historiquement, la première hypothèse sur l'origine de ce proton est la chaîne latérale de l'Asp27 qui est dirigée vers le site actif de la DHFR. C'est le seul résidu possédant un groupement ionisable dans le site actif et le pKa de cet acide aspartique est assez élevé puisqu'il est de 6,5. De plus de nombreuses expériences de mutagenèse dirigée sont venues étayer cette hypothèse. La mutation de l'Asp27 a un impact très important sur la réaction de transfert d'hydrure qui est aussi dépendante du pH (132). Chez les mammifères, il y a un acide glutamique à la place de l'acide aspartique, mais dans tous les cas il y a un acide aminé donneur de proton à cette position. Cependant, un mécanisme alternatif a été suggéré, dans lequel l'atome N5 du DHF est réduit par un proton du solvant, ce qui pourrait expliquer la dépendance au pH de la réaction (133, 134). Ce mécanisme est supporté par de récents calculs *in silico* où il est démontré qu'après la réduction du C6 du DHF, la chaîne latérale de la boucle M20 se déplace et le N5 du DHF devient accessible au solvant (135).

6.3.3 Les conformations et le site catalytique de la DHFR

Dans le complexe ternaire avec $NADP^+$ et folate, le cycle ptérine du substrat et le cycle nicotinamide du NADPH sont très proches dans le site actif. La boucle Met20 se referme comme un clapet sur le site actif et le protège du solvant. Les boucles F-G et G-H jouent des

rôles stabilisateurs *via* des liaisons hydrogène avec la boucle Met20. De nombreuses études cristallographiques de la DHFR en présence avec divers ligands montrent que la boucle M20 pourrait posséder 4 positions caractéristiques appelées: *occluded*, *closed*, *open*, et *disordered* (136) (Figure 18). Cependant, seules les conformations *occluded* et *closed* ont été observées dans des structures en solution déterminées par RMN (137). La conformation *open* de la boucle M20, seulement observée dans certains cristaux, apparaît être stabilisée par les mailles cristallines et la conformation *disordered*, observé pour la forme *apo* et en complexe avec le méthotrexate, résulterait de la moyenne des formes *occluded* et *closed* (136).

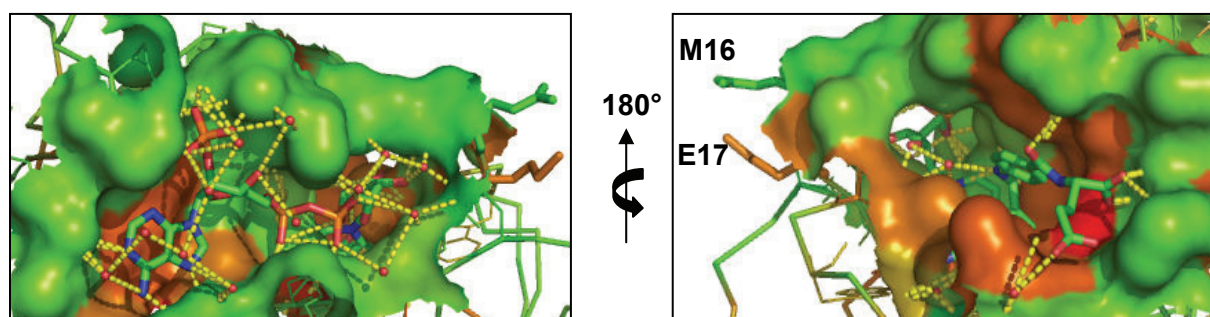


Figure 18 : Représentation du site catalytique de la DHFR (PDB : 1RX2). A gauche, le site de fixation du NADP⁺ et à droite le site de fixation du folate. La surface de la protéine est colorée selon l'hydrophobie des résidus.

La conformation de la boucle M20 dépend de la nature des ligands dans le site actif. Si seul le site du substrat est occupé, la DHFR adopte une conformation *occluded*. La fixation de la partie nicotinamide-ribose du NADPH dans la poche induit la conformation *closed* de l'enzyme, dans laquelle la boucle M20 est plaquée contre le cycle nicotinamide du cofacteur. Seule la conformation *closed* permet que les centres réactifs du cofacteur et du substrat soient assez proches dans le site actif pour permettre le transfert d'hydrure. De plus, la boucle M20 protège le site actif du solvant d'où le pKa élevé de l'acide aspartique donneur putatif de proton, l'Asp27. Les complexes E:folate:NADP⁺ et E:MTX:NADPH, sont connus pour être respectivement de bons modèles du complexe de Michaelis et de l'étape de transition (127, 136).

Les structures des conformations *closed* et *occluded* diffèrent de par la portion centrale de la boucle M20 et dans le réseau de liaisons hydrogène formé entre la boucle M20 et les boucles F-G et G-H. Dans la conformation *occluded*, la région centrale de la boucle M20 forme une hélice 3-10, la Met16 et le Glu17 sont projetés dans le site actif et obstruent le site de fixation de la partie nicotinamide du cofacteur. La conformation *occluded* est stabilisée par

des liaisons hydrogène entre l'Asn23 (CO et NH du squelette) dans la boucle Met20 et Ser148 (NH et O γ) dans la boucle G-H. Dans la conformation *closed*, les résidus 16-19 forment un coude β . La Met16 et la Glu17 sont tournées en dehors du site actif, permettant la fixation du NADPH, tandis que les chaînes latérales de l'Asn18 et de la Met20 sont plaquées sur le cofacteur et le substrat dans le site. La liaison hydrogène Asn23/Ser148 est rompue et deux nouvelles liaisons hydrogène sont créées entre le NH du squelette et l'O γ de l'Asp122 dans la boucle F-G et, le CO et NH du squelette de la Gly15 et Glu17, respectivement, comme on peut le voir sur la Figure 19 (136).

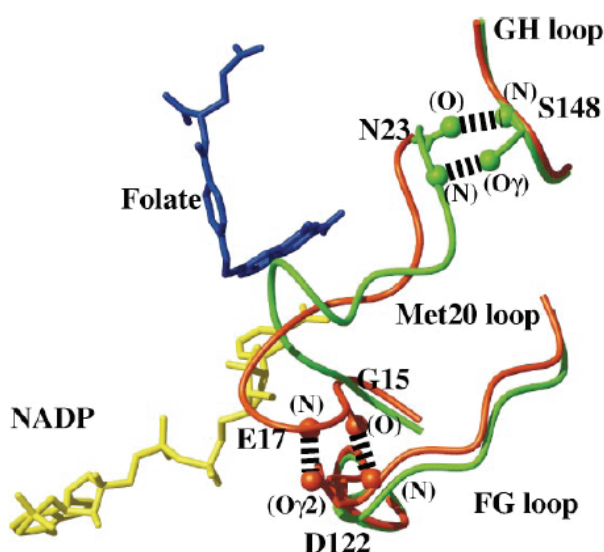


Figure 19 : Représentation de la boucle M20 et de ses interactions avec les boucles F-G et G-H sur une superposition des structures *closed* (en rouge) et *occluded* (en vert) de la DHFR. (138)

Il est probable que les rotations des deux sous domaines l'un par rapport à l'autre jouent un rôle dans la stabilisation de l'état de transition et dans la libération du THF qui est favorisée par la fixation du cofacteur. En effet, dans le complexe de Michaelis ou dans l'état de transition, la partie nicotinamide-ribose du cofacteur est sur son site de fixation, à proximité du cycle ptérine du substrat. A l'inverse, cette partie du cofacteur est exposée au solvant dans les complexes *occluded* DHFR:THF:NADP⁺ et DHFR:THF:NADPH (127).

6.3.4 La dynamique interne de la DHFR

6.3.4.1 Isomérisation et mobilité de la boucle M20

La forme *apo* de la DHFR existe sous deux conformations E1 et E2 (139-141). La vitesse d'interconversion entre les deux isoformes est de 0,035 s⁻¹ (142). À l'exception du MTX qui se fixe de la même manière aux deux isoformes, la fixation d'un ligand ne stabilise qu'un seul

type de complexe binaire. Cette échange conformationnel lent est observable par RMN pour des DHFR de différentes espèces et est à l'origine de l'effet hystérétique de la catalyse de l'enzyme. Lors de la mesure de l'activité de la DHFR, on observe une première phase de catalyse lente avant la phase de vitesse initiale (143).

En plus de cette isomérisation, la boucle M20 de l'apoenzyme oscille entre deux conformations à une vitesse de 35 s^{-1} (144). Cette vitesse de fluctuation est comparable à celle de la dissociation du produit du complexe ternaire DHFR:THF:NADPH (12 s^{-1}) (132). Le même type d'échange conformationnel est observable pour les complexes binaires avec le MTX (145) ou le folate (146). Si la région centrale de la boucle M20 (résidus 16-19) est mutée par une glycine, la vitesse du transfert d'hydrure est très réduite (par 500 fois) sans que l'affinité du substrat (DHF) ou du cofacteur (NADPH) soient significativement affectées (147). D'autres mutants de la DHFR (non mutés sur l'Asp27) possédant une vitesse de catalyse réduite ont également été étudiés (148). Ces mutations ralentissent fortement le mouvement de la boucle M20 et laissent penser que la mobilité de la boucle M20 est le facteur limitant de la dissociation du THF (149). L'échelle de temps de la fluctuation de la boucle M20 ($\sim 2\text{-}40\text{ s}^{-1}$) est la même que celle de la fixation du DHF ($\sim 40\text{ s}^{-1}$), du NADPH ($\sim 85\text{ s}^{-1}$) et de la libération du THF (12 s^{-1}) comme on peut le voir sur le cycle catalytique Figure 17. La boucle M20 aurait donc un rôle prépondérant dans la libération de ces ligands et régulerait l'activité de la DHFR (150).

6.3.4.2 La flexibilité du squelette peptidique de la DHFR

Les variations des facteurs B laissent suggérer que l'amplitude des mouvements de la DHFR varie le long de la chaîne peptidique mais également suivant le type de complexe étudié. Les différences sont plus importantes au niveau des boucles M20 et des boucles F-G qui possèdent des facteurs B faibles dans la conformation *closed* et élevés dans la conformation *occluded*. Ainsi, l'amplitude des mouvements de ces deux boucles est faible dans le cas de la conformation *closed* contrairement à la conformation *occluded*, ce qui suggère que l'amplitude des mouvements varie en fonction des ligands liés et par conséquent, durant le cycle catalytique (136).

La relaxation des spins en RMN permet d'avoir des informations sur la dynamique de chacun des résidus d'une protéine, sur une échelle de temps très large. La dynamique de la DHFR a été intensivement étudiée en utilisant plusieurs types d'expériences RMN décrites

dans la partie « Matériels et méthodes ». Les mouvements internes sont principalement décrits par le paramètre d'ordre S^2 , le temps de corrélation interne τ_e et la contribution de l'échange chimique R_{ex} au temps de relaxation transversale R_2 . Le paramètre S^2 est une mesure de l'amplitude des mouvements internes, τ_e nous renseigne sur l'échelle de temps du mouvement et la contribution R_{ex} apparaît lors de la présence de mouvements conformationnels lents, du domaine de la microseconde à la milliseconde (151).

La première étude de dynamique interne par RMN a été effectuée sur le complexe binaire DHFR:folate. Les résidus charnières Lys88 et Val88, Gly68 et Asp69 dans l'ABL, et plusieurs résidus dans les boucles M20 et F-G possèdent des valeurs de S^2 sous la moyenne de l'ensemble des résidus. L'amplitude importante des mouvements de ces résidus est associée avec des temps de corrélation interne de 1 ou 2 ns, bien plus court que le temps de corrélation interne de la protéine, qui est de l'ordre de 9 ns (137).

Les mesures ont ensuite été étendues à des complexes avec des analogues qui miment les différents intermédiaires du cycle catalytique, ces intermédiaires sont notés sur le cycle catalytique Figure 17 (en bleu).

L'échelle de temps et l'amplitude des mouvements du squelette de la DHFR dépendent tout d'abord de la conformation de la boucle M20. La dynamique du complexe DHFR:folate:DHNADPH est similaire à celle du complexe binaire avec le folate. Ce sont deux complexes en conformation *occluded*. Dans le cas de la conformation *closed* DHFR:folate:NADP⁺, les mouvements des boucles M20 et F-G sont atténués mais la flexibilité est augmentée pour les résidus composant l'ABL (*adenosin binding loop*). En cohérence avec la variation des facteurs B, la dynamique interne de la DHFR varie lors des étapes de son cycle catalytique, essentiellement pour les boucles M20 et F-G qui contrôlent l'accès au site actif. Il est probable que l'amplitude importante des mouvements de ces boucles dans la conformation *occluded* facilite la fixation du NADPH pour former le complexe de Michaelis et la libération du THF. Comme la boucle M20 bloque l'entrée du site de fixation du cycle nicotinamide du cofacteur dans la conformation *occluded*, une flexibilité importante est nécessaire pour la fixation du NADPH. Une fois que le cycle nicotinamide est fixé, la boucle M20 se referme sur le site actif et sa dynamique est réduite (127).

6.3.4.3 L'échange conformationnel entre les conformations *closed* et *occluded*

L'échange conformationnel à l'échelle de la microseconde à la milliseconde peut être mesuré à travers la contribution d'échange R_{ex} à la vitesse de relaxation R_2 . Elle a été mesurée implicitement *via* une analyse model-free (décrite dans la partie « matériel et méthode ») à l'aide des données de relation ^{15}N classique (137), puis directement *via* des expériences de dispersion de relaxation (152, 153). Lors de la formation du complexe DHFR:folate: NADP^+ , de l'échange conformationnel additionnel apparaît pour Leu24, Gly121 et His149 dans les régions qui possèdent des liaisons hydrogène entre les boucles M20, F-G et G-H. Ces différences à une échelle de temps lente semblent liées aux modifications structurales qui accompagnent la transition *occluded* à *closed*. Il est possible que la rupture de la liaison hydrogène entre l'Asn23 et la Ser148 permette des mouvements conformationnels lents qui influencent la vitesse de relaxation R_2 des résidus voisins. De la même manière, les processus d'échange observés pour la Gly121 ont été attribués à des modifications de liaisons hydrogène entre les boucles M20 et F-G, et d'autres contributions pour des acides aminés en contact avec les cycles ptérines et nicotinamide dans le complexe E:folate: NADP^+ .

Les mesures de relaxation ^{15}N sur le complexe fermé DHFR:folate: NADP^+ révèlent la présence d'échange conformationnel du site actif et des boucles à proximité à une échelle de temps comparable à celle de l'étape de transfert d'hydrure, 220 s^{-1} à pH 7 (132, 154). La plupart des résidus qui possèdent un terme d'échange ont des différences de déplacement chimique ^{15}N importantes entre les conformations *closed* et *occluded*, ce que suggère que l'échange entre les conformations *closed* et *occluded* est lent sur l'échelle des déplacements chimiques.

Les structures cristallographiques des complexes *closed* et *occluded*, montrent que les variations structurales entre les deux conformations permettent l'entrée et la sortie du cycle nicotinamide du site actif. La découverte que l'échange conformationnel de la boucle M20 entre les formes *occluded* et *closed* est intrinsèque à la structure de la DHFR d'*E. coli*, indique que celle-ci joue probablement un rôle dans la fixation du substrat et la catalyse.

Les expériences RMN de dispersion de relaxation permettent de quantifier la cinétique et la thermodynamique de l'échange conformationnel des résidus qui possèdent une contribution R_{ex} , mais également de déterminer des populations en échange. Ces expériences ont été utilisées, très récemment, pour caractériser les états de haute énergie les moins peuplés lors du cycle catalytique de la DHFR d'*E. coli*. À chaque étape du cycle, des conformations

minoritaires ressemblent à la structure de l'état fondamental des étapes précédentes et suivantes. La fixation et la libération des ligands s'opèrent à travers ces sous-états excités et les vitesses du transfert d'hydrure et de la catalyse sont gouvernées par les transitions entre l'état fondamental et les états excités d'une étape donnée. Ainsi, la modulation du paysage énergétique par les ligands liés contrôle l'enzyme tout au long de son cycle catalytique suivant un chemin préférentiel (153).

7. Objectifs de la thèse

Les osmolytes organiques sont accumulés, lors d'une contrainte hyperosmotique, dans les cellules et les tissus de nombreux organismes pour maintenir le volume cellulaire. Ces solutés ont également un rôle essentiel dans la sauvegarde de l'intégrité cellulaire et dans la stabilisation des protéines contre l'effet d'autres stress environnementaux comme la température, la dessiccation, la présence de radicaux libres ou d'agents dénaturants. Par conséquent, ces chaperonnes moléculaires ont un rôle bien plus complexe que le simple maintien de la pression osmotique.

Ils sont fréquemment appelés « solutés compatibles » de par leur impact limité sur la fonction cellulaire et l'activité des protéines. Les osmolytes à haute concentration peuvent néanmoins induire une inhibition significative de certaines enzymes et l'amplitude de cet effet dépend du couple protéine-osmolyte étudié. Chaque osmolyte possède ses propres propriétés stabilisatrices et son influence spécifique sur la dynamique interne des macromolécules est encore mal définie. Ainsi depuis deux décennies, de nombreuses études ont pour objectif de comprendre les bases moléculaires de l'effet des osmolytes sur les macromolécules.

Dans ce contexte, nous avons choisi la DHFR d'*E. coli* comme système d'étude pour essayer d'expliquer l'origine des différences d'inhibition de l'activité, observées avec différents osmolytes (Thèse S. Renaud (155)). La DHFR est un excellent candidat pour notre étude de par son rôle central dans le métabolisme cellulaire et de par la quantité d'information exceptionnelle sur cette enzyme dans la littérature. Notre objectif est d'apporter à terme une contribution significative à la compréhension de l'effet des osmolytes sur les propriétés des protéines *via* des études sur l'activité, la structure et la dynamique interne de la DHFR. Nous espérons ainsi apporter de nouveaux éléments de réflexion sur la sélection qui a conduit à la répartition des osmolytes dans les différents taxons.

Nous avons tout d'abord mesuré l'activité de la DHFR en présence de différents osmolytes : glycérol, tréhalose, glycine bêtaïne et TMAO. Après avoir vérifié l'intégrité de la structure globale de la DHFR en présence de ces différents solutés, nous avons ensuite étudié le pouvoir stabilisateur de ces osmolytes sur la DHFR. Enfin, nous avons tenté de caractériser la nature des interactions osmolytes-DHFR avant d'étudier l'impact de la glycine bêtaïne et du tréhalose, qui sont les osmolytes majeurs chez *E. coli*, sur la dynamique interne de la DHFR.

PARTIE II

Matériels et méthodes

1. Production et purification de la DHFR

Le clonage, la construction du plasmide contenant le gène de la DHFR et la transformation de la souche *E. coli* C41 ont été effectués par S. Renaud dans le cadre de ses travaux de thèse (155). La souche recombinante nous a généreusement été donnée par l'équipe DUALS (Dualité ou Universalité dans l'Adaptation lors de Stress Oxydants chez les Protéobactéries) de l'UMR CNRS 6026 de l'université de Rennes 1. Un protocole de production et de purification de la DHFR nous a été fourni par S. Bonnassie (Equipe DUALS).

Les bactéries recombinantes ont été cultivées dans du milieu LB contenant 50 mg/mL de néomycine, sous agitation (100 rpm/min) à 37°C, jusqu'à une $DO_{570} \sim 0.8$. La surexpression de DHFR est ensuite induite par 1 mM d'IPTG. Après 4h, les bactéries sont culotées et rincées dans du tampon KP 50 mM pH 7,1, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, β -mercaptoéthanol 1 mM. Les culots sont repris dans 5 mL du même tampon pour 100 mL de culture auquel on ajoute des anti-protéases (leupeptine 20 μ g/mL, pepstatine 2 μ g/mL, inhibiteur de la trypsine 40 μ g/mL, PMSF 1mM) et 0.5 mg/mL de lysozyme pour fragiliser la membrane bactérienne. Les cellules sont ensuite cassées par sonication, 10 fois 30s dans la glace. Les débris cellulaires et les cellules non cassées sont ensuite éliminés par centrifugation (15 min, 5000 rpm à 4°C). On récupère l'extrait brut contenant la DHFR qui, après filtration sur des filtres de 0,45 μ m, est purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne méthotrexate-agarose.

La colonne d'affinité est lavée avec de l'eau distillée puis équilibrée avec 40 mL de tampon KCl 50 mM pH 7,1, EDTA 0,1 mM, KCl 50 mM et β -mercaptoéthanol 1 mM. L'extrait brut est déposé, puis on lave la colonne avec 20 mL du tampon d'équilibration de la colonne avec un gradient de KCl (250 mM, 500 mM, 750 mM, 1 M), à raison de 10 mL pour chaque concentration en KCl. L'augmentation graduelle de la force ionique permet de décrocher les contaminants qui auraient pu se lier de manière aspécifique sur la colonne et renforce l'affinité de la DHFR pour le méthotrexate greffé sur la colonne (156). La colonne est ensuite rincée avec 20 mL de KCl 50 mM pH 7,1, EDTA 0,1 mM et β -mercaptoéthanol 1 mM. L'élution est effectuée avec 6 mL de folate 3 M à pH 8. Les fractions recueillies sont ensuite déposées sur un gel SDS-PAGE afin de vérifier la présence de la protéine et d'évaluer la

pureté de l'éluât. Les échantillons retenus subissent une dialyse-concentration contre l'eau et sont ensuite lyophilisés, puis stockés à -20°C.

Pour marquer la DHFR à l'azote ^{15}N , on cultive les bactéries dans un milieu minimum (M9), auquel on ajoute du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ comme unique source d'azote. Onensemence 5 mL de milieu LB pour relancer la croissance de la souche bactérienne, puis on effectue des étapes de pré-culture dans du milieu M9 afin de garantir l'enrichissement de l'enzyme en isotope. Dans ces conditions de culture, le taux de marquage à l'azote 15 déterminé par RMN, est supérieur à 90%.

2. Détermination de l'activité enzymatique de la DHFR

Les mesures d'activité ont été effectuées dans du tampon KP 50 mM, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 6.8 à 20°C. Les concentrations de DHFR, DHF et de NADPH ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre en utilisant comme coefficients d'extinction molaire respectivement : $31100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 280 nm, $28000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 282 nm et $6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 339 nm (157). Des solutions mères de chaque osmolyte ont été préparées avec du tampon KP pour ajouter au mélange réactionnel afin de mesurer l'activité de la DHFR en présence d'osmolytes (Glycérol 4 M, tréhalose 1,5 M, TMAO 4 M, GB 4 M).

L'activité enzymatique a été déterminée avec un spectrophotomètre Jasco V-650 pour la mise au point des mesures, puis avec un stopped-flow BioLogic MPS-60. L'utilisation du stopped-flow permet de multiplier les mesures avec des mélanges homogènes, difficilement réalisables manuellement avec des échantillons ayant des viscosités élevées. Cet appareil est constitué d'une cuve avec quatre seringues qui permettent d'injecter des réactifs, et est couplé avec un spectrophotomètre UV/visible et/ou un fluorimètre pour suivre des cinétiques de réaction très rapides, de l'ordre de la milliseconde. L'utilisation comme « mélangeur » de solution visqueuse est assez atypique mais donne des résultats très satisfaisants. Cela nous a permis de multiplier les expériences dans des conditions identiques et de varier les concentrations des osmolytes dans le milieu en faisant varier le volume d'injection.

L'enzyme est pré-incubée avec le DHF pendant 10 min avant l'ajout du NADPH afin d'éviter l'effet hystérétique de l'enzyme. On suit la diminution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps, ce qui correspond à la conversion du NADPH en NADP^+ puis la pente à l'origine est mesurée à l'aide du logiciel Biokine (157).

L'activité spécifique de l'enzyme est calculée suivant l'équation :

$$\frac{\left[\frac{\left(\frac{\Delta Abs}{\Delta t} \right) \times V_{cuve}}{\epsilon_{réaction}} \right]}{m(DHFR)} = \text{Activité spécifique} \quad [7]$$

où $\frac{\Delta Abs}{\Delta t}$ correspond à la variation d'absorbance en fonction du temps (en min). $\epsilon_{réaction}$ est le coefficient d'extinction molaire de la réaction ($12300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). V_{cuve} est le volume réactionnel en μL et $m(DHFR)$ la masse de protéine (en mg) dans le mélange réactionnel. L'activité spécifique est alors définie par la quantité de produit formé par minute et par milligramme de protéine (en $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$).

3. Le dichroïsme circulaire

3.1 Principe de base du dichroïsme circulaire

Une onde lumineuse est dite linéairement polarisée lorsque son vecteur champ électrique oscille dans un plan fixe au cours du temps. Pour une lumière polarisée circulairement, le champ électrique est d'amplitude constante mais tourne autour de sa direction de propagation. Il forme ainsi une hélice lorsqu'il se propage dans l'espace. Si c'est une hélice gauche, la lumière est dite polarisée circulairement gauche et vice versa pour une hélice droite.

Dans une expérience de dichroïsme circulaire, des lumières polarisées circulairement gauche et droite, de même intensité et de même longueur d'onde sont alternativement envoyées vers un échantillon. Si l'échantillon a une structure chirale il sera doué d'une activité optique (ou pouvoir rotatoire) et l'une des deux polarisations sera absorbée plus que l'autre, c'est le phénomène de dichroïsme. C'est cette différence d'absorption, dépendante de la longueur d'onde, qui est mesurée dans un spectre de dichroïsme circulaire.

À une longueur d'onde donnée

$$\Delta A = A_g - A_d \quad \text{avec} \quad A_{g,d} = \log \left(\frac{I_0}{I_{g,d}} \right) \quad [8]$$

est la différence d'absorbance des deux composantes gauche et droite.

En utilisant la loi de Beer-Lambert on peut écrire :

$$\Delta A = (\varepsilon_g - \varepsilon_d) C \ell \quad [9]$$

où $\Delta\varepsilon = (\varepsilon_g - \varepsilon_d)$ est la différence des coefficients d'extinction molaire encore appelé le dichroïsme circulaire molaire.

On peut également exprimer le pouvoir dichroïque d'une substance à l'aide de l'ellipticité θ (exprimée en degrés) de l'onde résultante. Cette onde est la somme des ondes circulaires gauche et droite après traversée de la substance, sa polarisation est elliptique : le champ électrique décrit une ellipse autour de la direction de propagation. L'ellipticité est alors définie par :

$$\theta = \text{Arctan} \frac{b}{a} \quad [10]$$

où b et a sont respectivement le petit axe et le grand axe de l'ellipse décrite par l'onde.

Les grandeurs θ et ΔA sont liées par la relation :

$$\theta = 32,98 \Delta A \sim 33 \Delta A. \quad [11]$$

L'unité couramment utilisée dans les expériences de dichroïsme circulaire est l'ellipticité molaire $[\theta]$, qui permet de normaliser les spectres, en s'affranchissant du trajet optique ℓ et de la concentration de l'échantillon C . L'ellipticité et l'ellipticité molaire sont liées par la relation :

$$[\theta] = \frac{100 \times \theta}{C \ell} \approx \frac{100 \times 33 \Delta A}{C \ell} \approx 3300 \Delta \varepsilon \quad [12]$$

où ℓ est exprimée en cm, C en mol.l⁻¹ et $[\theta]$ en °.cm².dmol⁻¹.

3.2 Dichroïsme circulaire des peptides et des protéines

Les spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (190 à 250 nm) permettent de caractériser qualitativement et quantitativement les structures secondaires d'une protéine. À ces longueurs d'ondes, le chromophore est la liaison peptidique. Les spectres de dichroïsme circulaire sont utilisés pour déterminer les taux (%) de structure secondaire d'une protéine conformée en hélice α , en feuillet β , en coude, ou non structurée (158). Le spectre enregistré reflète la somme de toutes les conformations que la protéine adopte en solution. Afin de caractériser les taux de chaque structure secondaire, il est nécessaire de déconvoluer le

spectre. Pour ceci des outils en ligne sont disponibles comme le site DichroWeb³ qui permet d'utiliser plusieurs algorithmes de déconvolution.

Ainsi, le dichroïsme circulaire (CD pour *Circular Dichroism*) est une méthode très sensible pour étudier les modifications structurales d'un peptide ou d'une protéine avec la température, le pH, la salinité du milieu ou la présence d'agents dénaturants. Néanmoins des concentrations importantes en DTT, en histidine, en imidazole ou en ions Cl⁻ ne peuvent pas être utilisées dans l'UV lointain, car l'absorbance devient trop importante et le photomultiplicateur sature.

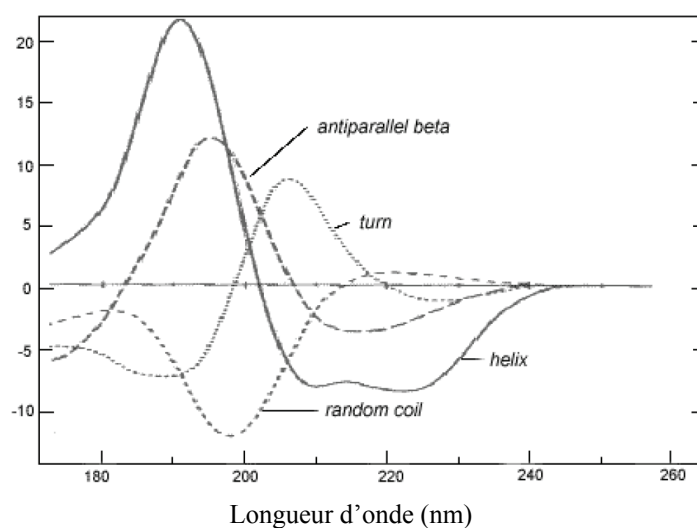


Figure 20 : Spectres de dichroïsme circulaire, caractéristiques des différentes structures secondaires dans l'UV lointain. (159)

Les spectres de dichroïsme circulaire dans le proche UV (> 250 nm) permettent d'obtenir des informations sur la structure tertiaire des protéines (Figure 20). Les signaux obtenus entre 250 et 300 nm sont dus à l'absorption et à la nature de l'environnement des phénylalanines, tyrosines, cystéines (ponts disulfures) et des tryptophanes. De même, on peut obtenir des informations structurales sur la nature des groupes prosthétiques des protéines comme l'état de l'hème dans l'hémoglobine ou dans le cytochrome c.

Enfin, le dichroïsme circulaire dans le visible est une technique puissante pour étudier les interactions métaux-protéines. Le système détecte les ions métalliques en environnement chiral, les ions non liés ne sont pas détectés (160). Dans cette gamme spectrale, on peut donc aisément étudier l'effet du pH ou du tampon, ainsi que la stœchiométrie des complexes métaux-protéines.

³ www.dichroweb.com

3.3 Expériences de dénaturation thermique

La stabilité thermique des protéines est mesurée en enregistrant des spectres CD pour des températures croissantes. On peut suivre l'évolution du spectre dans l'UV lointain ou proche, pour une rampe de température donnée. Le plus souvent, on choisit une longueur d'onde spécifique (par exemple 222 nm pour les hélices α) et on enregistre en continu le signal à cette longueur d'onde en augmentant la température jusqu'à 85°C. Si la dénaturation est réversible, la température de fusion de la protéine est directement liée à sa stabilité conformationnelle et ses propriétés thermodynamiques peuvent être extraites des données de dénaturation thermique. La coopérativité de la dénaturation de la protéine est mesurée qualitativement par la largeur et la forme de la transition de dénaturation.

3.4 Mesure de la stabilisation par les osmolytes

La dénaturation chimique d'une protéine peut être étudiée en ajoutant graduellement des agents dénaturants comme l'urée ou du chlorure de guanidinium à une température donnée. Ainsi, des études sur un grand nombre de protéines en présence d'urée ou d'osmolytes protecteurs ont permis de déterminer de manière empirique des principes généraux sur les interactions protéines-osmolytes. La variation d'énergie libre ΔG^0 d'une protéine :

$$\Delta G^0 = -RT \ln \left(\frac{[D]}{[N]} \right) \quad [13]$$

où $[D]$ et $[N]$ sont les concentrations des formes dénaturée et native de la protéine, dépend linéairement de la concentration en urée C_u :

$$\Delta G^0(C_u) = \Delta G^0(C_u = 0) + m \times C_u \quad [14]$$

La pente m de ΔG^0 en fonction de C_u est appelé la « m -value » et correspond à la variation de la stabilité de la protéine en fonction de la concentration en urée (56).

De la même manière, la stabilité des protéines évolue de façon linéaire avec la concentration en osmolytes stabilisateurs. Cependant dans ce cas, la température de demi-dénaturation T_m augmente avec la concentration en osmolytes. Par analogie, il est donc possible de déterminer une « m -value », en $K.M^{-1}$ pour décrire le pouvoir stabilisateur d'un osmolyte pour une protéine donnée (61).

3.5 Conditions et traitements des mesures par dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés à 20°C sur un spectropolarimètre Jasco J-815, équipé d'un module de contrôle de température de type Peltier. La protéine est à une concentration de 10 µM dans du tampon KP à pH 6,8 en présence de concentrations variables en osmolytes à partir des solutions mères de solutés utilisées pour les tests d'activité. Un tampon KP contenant 1,5 M en KCl a été préparé pour enregistrer des spectres avec des concentrations variables en KCl. Les solutions d'osmolytes sont les mêmes que celles utilisées pour les mesures d'activité.

Le pouvoir dichroïque de l'échantillon, exprimé en millidegrés par le polarimètre, peut être converti en ellipticité molaire (°.cm².dmol⁻¹). Afin d'évaluer le pourcentage de chaque type de structure secondaire (hélice α et brins β), les spectres ont été déconvolués à l'aide de deux algorithmes : CONTIN (158) et SELCON (161) en ligne sur le site internet DichroWeb⁴.

La dénaturation thermique avec différentes concentrations en osmolyte a été suivie à 219 nm avec une augmentation de température de 1°C.min⁻¹ de 15°C à 85°C. L'évolution du signal enregistré en fonction de la température a été ajustée au modèle d'une transition entre deux états avec la relation suivante :

$$y = \frac{(\alpha_N + \beta_N T) + (\alpha_D + \beta_D T)}{1 + e^{\left(\frac{-\Delta G_{UN}}{RT}\right)}} \quad [15]$$

où y est le signal enregistré à 219 nm à une température T , α_N et α_D sont les ordonnées à l'origine des plateaux et β_N et β_D sont les pentes des plateaux de l'état natif (N) et de l'état dénaturé (D) respectivement. ΔG_{UN} est l'énergie libre de dépliement et R est la constante des gaz parfaits exprimé en cal.mol⁻¹.K⁻¹. Afin de faciliter l'analyse, cette équation est réécrite sous la forme (162):

$$y = \frac{(\alpha_N + \beta_N T)}{1 + e^{4T_m(T-T_m)/T\Delta T}} + \frac{(\alpha_D + \beta_D T)}{1 + e^{4T_m(T-T_m)/T\Delta T}} \quad [16]$$

où T_m est la température de fusion et ΔT est la largeur de la transition thermique. Le logiciel SigmaPlot 10.0 a été utilisé.

⁴ www.Dichroweb.fr

Les expériences de dénaturation thermique ont été doublées afin d'évaluer l'erreur sur la mesure de la température de fusion T_m .

4. La spectroscopie de fluorescence

4.1 La fluorescence des protéines

L'absorption des photons dans les protéines est essentiellement liée aux acides aminés aromatiques : tryptophane, tyrosine, phénylalanine. Ce sont les seuls qui présentent un spectre d'absorption entre 250 et 320 nm et qui sont fluorescents. Ils possèdent des propriétés différentes en termes d'absorbance, d'émission, de durée de vie et rendement quantique, comme on peut le voir sur le tableau ci-dessous:

| Résidus | Temps de vie (ns) | Absorption | | Emission | |
|---------|-------------------|-----------------------------|---|----------------------------|----------|
| | | λ_{abs} (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) | λ_{em} (nm) | Φ_F |
| Trp | 2.6 | 280 | 5600 | 350 | 0,2 |
| Tyr | 3.6 | 275 | 1400 | 310 | 0,14 |
| Phe | 6.4 | 260 | 200 | 300 | 0,04 |

Tableau 3 : Paramètres de fluorescence de Trp, Tyr et Phe. λ_{abs} et λ_{em} sont respectivement les longueurs d'absorption et d'émission de fluorescence, le coefficient d'extinction molaire et Φ_F est le rendement quantique de fluorescence dans l'eau.

Il faut noter que les valeurs de paramètres de fluorescence varient avec la composition du milieu d'étude. Le rendement quantique de fluorescence Φ_F est le rapport entre le nombre de photons absorbés et le nombre de photons émis.

La fluorescence des protéines est essentiellement liée aux tryptophanes, les autres résidus absorbant très peu et ayant des rendements quantiques plus faibles. On ne les détecte donc que s'il n'y a pas de tryptophanes dans le système étudié. Si on utilise des longueurs d'onde d'absorption λ_{abs} plus courtes, d'autres groupements chimiques absorbent comme la liaison peptidique (vers 200 et 240 nm), cependant leurs rendements quantiques de fluorescence sont trop faibles pour être utilisés. Les ponts disulfures ou les groupements sulfhydriles (-SH) absorbent également mais possèdent des coefficients d'extinction molaire très faibles.

Pour des longueurs d'ondes supérieures à 290 nm, les résidus tryptophanes sont sélectivement excités et le transfert d'énergie entre résidus tryptophanes est très faible (163). Le maximum du pic d'émission, variant de 300 à 350 nm en fonction de la polarité de l'environnement est donc sensible à l'exposition au solvant. Par conséquent, la fluorescence du tryptophane peut

être utilisée comme une sonde de l'état conformationnel d'une protéine (164). De plus, la fluorescence du tryptophane est fortement influencée par la proximité d'autres résidus. Par exemple, les groupements protonés des chaînes latérales comme celles de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique peuvent induire un quenching de la fluorescence. Il est difficile de rationaliser les variations de rendements quantiques qui, de plus, peuvent résulter de facteurs superposés.

4.2 Conditions d'études

Après excitation à une longueur d'onde de 295 nm (bande passante de 1 nm), les spectres d'émission de fluorescence de la DHFR ont été enregistrés à 20°C sur un spectrofluorimètre Fluorolog 3 (Horiba Jobin-Yvon, France), en utilisant des cuves en quartz de 10 × 4 mm. Les échantillons contiennent 10 µM de DHFR dans le tampon KP à pH 6,8 en présence de divers osmolytes. La quantité de protéine de chaque cuve a été vérifiée en mesurant l'absorbance à 280 nm et la quantité de fluorescence émise est exprimée en unité arbitraire.

5. La RMN des protéines

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est aujourd'hui une des techniques les plus utilisées pour établir les structures en solution de nouvelles molécules de petites tailles extraites de milieux naturels ou obtenues par synthèse. Les principes de bases de la RMN ont été résumés dans l'annexe 1. On peut obtenir des informations à l'échelle de l'atome plus ou moins détaillées, allant de la formule brute à la structure tridimensionnelle.

En 50 ans, les avancées techniques et instrumentales ont été fulgurantes et la RMN à haute résolution est devenue une technique importante à côté de la diffraction des rayons X (RX) ou radiocristallographie pour la détermination de structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques à l'échelle atomique. La première structure *de novo* de protéine globulaire déterminée par RMN, fut résolue par le groupe de K. Wuthrich en 1985 pour un inhibiteur de protéase (BPTI) (165). Actuellement, plus de 7000 structures de protéines ont été déterminées par RMN et déposées dans la PDB⁵ (Protein Data Bank). Ces structures à l'échelle de l'atome ont souvent permis de confirmer l'importance des résidus conservés dans les séquences, de par leurs positions spatiales par rapport à des sites catalytiques ou à des surfaces d'interaction.

⁵ <http://www.rcsb.org/pdb/>

In situ, la fonction biologique d'une protéine est intimement liée à sa dynamique en solution et peut être modulée par l'interaction avec d'autres protéines ou des substrats. Par exemple, de nombreuses études ont démontré que lors de l'interaction entre deux partenaires, le processus de reconnaissance entre molécules ne peut être décrit selon un concept clé-serrure entre deux structures rigides. Si la rigidité moléculaire assure la spécificité de la reconnaissance d'un ligand, une protéine doit être assez flexible pour qu'il y ait association entre les deux partenaires. L'activité biologique d'une protéine est reliée à ces propriétés dynamiques en solution. La RMN permet par ailleurs de caractériser des interactions moléculaires, ainsi que de décrire les propriétés dynamiques des molécules sur une grande échelle de temps.

Pour étudier un échantillon par RMN, il est nécessaire d'avoir un produit pur, monodisperse, concentré (de l'ordre de la centaine de micromolaire), de masse moléculaire raisonnable (maximum 30 kDa). Il faut également que l'échantillon soit stable dans le temps, les études se font souvent à température ambiante, et une série d'expériences peut durer plusieurs semaines. Par conséquent, la recherche de conditions d'étude optimales (force ionique, pH, température...) est essentielle pour l'étude des molécules biologiques en solution. La richesse et la qualité des informations qui découleront des expériences RMN seront en grande partie dépendantes de la qualité de l'échantillon. La RMN est une technique peu sensible comparée aux techniques spectrophotométriques (dichroïsme circulaire, fluorescence du tryptophane, diffusion dynamique de la lumière...) qui ne nécessitent que quelques micromolaires de protéines. Par conséquent, des efforts importants ont été menés sur l'instrumentation et sur l'optimisation des séquences d'impulsion afin d'améliorer la sensibilité des expériences RMN. Les développements les plus importants en RMN sont présentés dans l'annexe 1.

5.1 Le déplacement chimique

5.1.1 Le déplacement chimique et les paramètres structuraux des protéines

Le déplacement chimique est la grandeur liée aux différentes fréquences de résonance de noyaux de même nature. Ces fréquences de résonance étant liées à l'environnement électronique des noyaux, le déplacement chimique dépend de l'environnement local de chaque atome. Ainsi divers paramètres structuraux comme la géométrie des liaisons, la proximité d'un cycle aromatique, d'un noyau paramagnétique, la présence de liaisons hydrogène, etc. peuvent ainsi moduler la valeur du déplacement chimique.

Wishart et ses collaborateurs ont ainsi mis à profit la sensibilité du déplacement chimique pour définir le *chemical shift index (CSI)*. Cet index permet d'identifier les régions d'une protéine possédant un type donné de structure secondaire simplement à partir des déplacements chimiques des protons H_α . Il a ensuite été étendu aux carbones C_α , C_β et CO (166, 167). Un algorithme basé sur ce principe a ensuite été implémenté dans le logiciel Talos pour prédire les angles de torsion ϕ et ψ à partir d'homologies de séquences et des déplacements chimiques H_α , N, C_α , C_β , CO (168).

5.1.2 Le déplacement chimique pour identifier les interactions moléculaires

On peut suivre les modifications de déplacements chimiques d'une protéine lors d'un changement de milieu (tampon, pH, force ionique...) et identifier les régions qui subissent des modifications d'environnement atomique.

Les variations des déplacements chimiques d'une protéine en présence d'un ligand ou d'un partenaire témoignent d'une interaction pouvant être accompagnée ou non d'une modification conformationnelle (il est toutefois difficile de discriminer entre les variations liées à la complexation et celles uniquement liées aux changements conformationnels). C'est le principe du *chemical shift mapping*, technique largement utilisée pour définir des surfaces d'interactions protéine-protéine ou encore des sites actifs où se fixent des ligands. Nous avons exprimé les modifications de déplacement chimique de chaque proton amide à l'aide de la relation suivante (169, 170) :

$$\Delta\delta_{\text{tot}} = ((\Delta\delta_{\text{HN}})^2 + (0,16 \Delta\delta_{\text{N}})^2)^{1/2} \quad [17]$$

où $\Delta\delta_{\text{HN}}$ et $\Delta\delta_{\text{N}}$ sont les différences de déplacement chimique du proton H_N et respectivement de l'azote ^{15}N , en absence et en présence d'osmolytes.

5.1.3 Les conditions d'études et expériences de *chemical shift mapping* sur la DHFR

S'il est possible de suivre les déplacements chimiques ^1H , ^{15}N et ^{13}C , le plus courant dans la littérature est d'utiliser seulement les protons et azotes, en enregistrant des spectres qui corrélient le proton amide à l'azote qui le porte. Le proton et l'azote apportent des informations complémentaires sur les variations de leur environnement. L'azote possède une dispersion importante avec une largeur spectrale d'environ 40 ppm contre 5 ppm pour les

protons amides. Les protons amides sont répartis le long du squelette peptidique, Il est donc facile d'évaluer rapidement les effets, même minimes, des osmolytes sur l'ensemble de la structure de la DHFR en enregistrant des spectres RMN du type 2D ^{15}N -HSQC.

Les complexes binaire E:folate (*occluded*) et ternaire E:folate:NADP⁺ (*closed*) ont été formés avec 1 mM de DHFR marquée ^{15}N , 6 mM folate et 6 mM NADP⁺ pour le complexe de Michaëlis dans du tampon KP contenant 10% D₂O. La concentration de DHFR dans le tube de RMN et les concentrations de solution mère de ligands dissous dans du tampon KP ont été vérifiées à l'aide du spectrophotomètre UV-visible ([folate]=0,12 M, [NADP⁺]=0,08 M). Il est nécessaire de dissoudre le folate dans une solution très basique, puis de réajuster le pH par la suite. La dissolution du NADP⁺ induit une chute de pH du tampon KP qui a été corrigée immédiatement avec du KOH pour éviter l'hydrolyse acide du NADP⁺ (137). L'effet de cinq osmolytes a été suivi : le glycérol, le tréhalose, le TMAO, la GB et le KCl. Des concentrations croissantes en osmolytes sont ajoutées, après chaque addition le pH a été contrôlé et un spectre 2D ^{15}N -HSQC enregistré. Ces conditions sont celles qui ont ensuite été utilisées pour la majorité des expériences RMN.

Les expériences RMN ont été enregistrées à 306,4 K sur un spectromètre Bruker Avance 500 équipé avec une cryosonde triple-résonance (^1H , ^{13}C , ^{15}N). La température de l'échantillon dans le spectromètre a été calibrée avec le tube standard Bruker de méthanol deutéré contenant 4% de méthanol. Les spectres ^{15}N -HSQC ont été enregistrés en mode phasé en F1 en utilisant le mode de sélection des gradients *Echo anti-Echo*. Les expériences ont été typiquement enregistrées en 2 scans, jusqu'à 8 scans pour des concentrations importantes en osmolytes. La fenêtre spectrale est de 16 et 32 ppm dans les dimensions proton et azote, les porteuses ont été fixées à la fréquence de résonance de l'eau et à 118 ppm, respectivement. Une matrice de $2048(t_2) \times 256(t_1)$ points a été acquise et a subi un *zero filling* jusqu'à 2048×1024 points après une apodisation cosinus carré et une prédiction linéaire en F1. Le délai de relaxation d_1 utilisé est de 2 s. Les spectres ont été traités avec Topspin ou les logiciels NMRPipe/NMRDraw (171) et visualisés avec Topspin ou NMRView (172).

L'attribution des pics de corrélations ^1H - ^{15}N de nos spectres a été effectuée à partir des listes de déplacements chimiques 5740 et 5741 des complexes DHFR:folate et DHFR:folate:NADP⁺ déposées dans la BMRB⁶ (*Biological Magnetic Resonance Bank*).

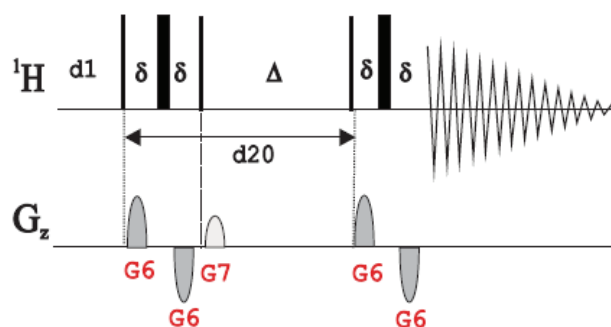
⁶ <http://www.bmrb.wisc.edu/>

5.2 Détermination des coefficients de diffusion translationnelle par RMN

Les molécules en solution ne sont pas immobiles mais se déplacent de manière aléatoire en rencontrant d'autres molécules et des obstacles : c'est le mouvement Brownien. Ce déplacement des molécules peut être évalué par la détermination du coefficient de diffusion translationnelle *via* les expériences de RMN à gradients de champs pulsés (NMR–PFGSE) (173). Cette méthode permet de suivre la solubilisation de poudres, de mettre en évidence des interactions entre molécules ou des autoassemblages, de caractériser les processus de repliement et de dépliement de protéines, etc. Nous avons utilisé cette méthode pour déterminer les coefficients de diffusion de l'eau et de différents ligands de la DHFR en présence de plusieurs types d'osmolytes.

5.2.1 L'expérience RMN–PFGSE

L'expérience RMN–PFGSE (*Pulse Field Gradient Spin Echo*) est principalement constituée de deux impulsions gradient z identiques d'amplitude g (G_6) et de durée δ séparées par un délai Δ . La première impulsion gradient a pour effet de défocaliser les spins qui précessent librement autour de z pendant le temps Δ avant d'être refocalisés par la seconde impulsion gradient. Néanmoins, comme la molécule se déplace dans le milieu, elle ne subira pas le même effet de gradient lors de la seconde impulsion, par conséquent la refocalisation ne sera pas complète et le signal sera atténué. Il est évident que l'on ne mesure pas la diffusion d'une seule molécule, mais la diffusion d'une espèce chimique en solution (173-175). Nous avons utilisé la séquence `stebpgp1s` :



Les coefficients de diffusion sont mesurés à l'aide de spectre RMN 2D, en incrémentant soit la durée δ des impulsions de gradient, soit l'amplitude des gradients g en gardant constants la durée entre les impulsions de gradient et le temps total de l'écho.

L'atténuation du signal causée par l'action d'une paire de gradient est la suivante :

$$I = I_0 e^{(-\gamma^2 g^2 D \delta^2 (\Delta - \delta/3))} \quad [18]$$

où I et I_0 sont les intensités respectives du signal en présence et en absence de gradients, γ est le rapport gyromagnétique du noyau étudié, D est le coefficient de diffusion translationnelle. Plus la vitesse de diffusion de la molécule est importante, plus elle se déplace dans le milieu durant le délai Δ et plus le signal RMN lors de l'expérience PFGSE décroît rapidement avec la force des gradients comme on peut le voir sur la Figure 21.

L'intensité du signal résultant en fonction de l'intensité des gradients est ajustée suivant la relation [18] pour obtenir D .

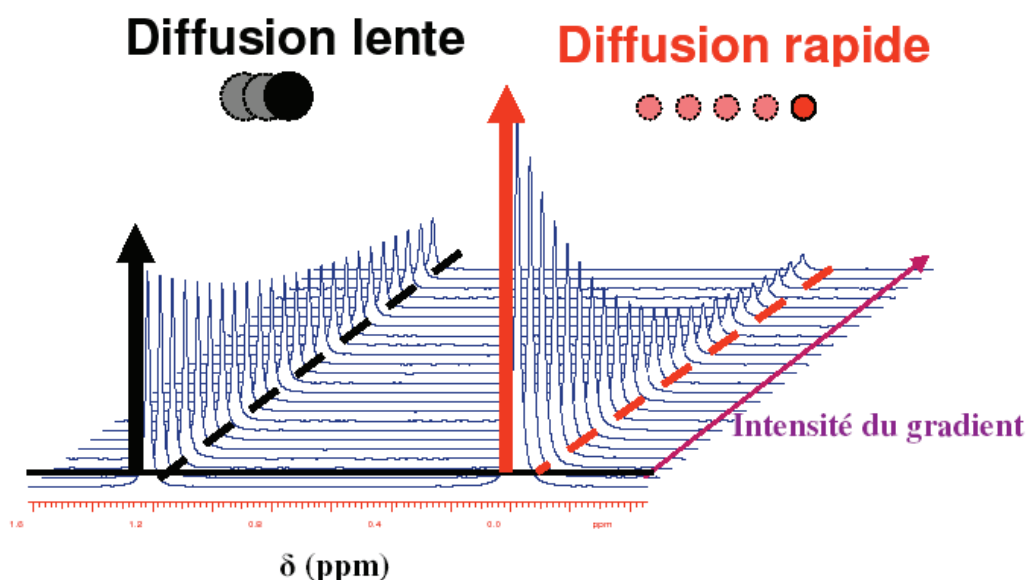


Figure 21 : Région d'un spectre 2D RMN-PFGSE avec 2 espèces chimiques en solution dont les coefficients de diffusion translationnelle sont différents. Le spectre est composé d'une série de spectre 1D ^1H avec des puissances variables d'impulsion de gradient.

Le rayon hydrodynamique R_h de la molécule, la viscosité η du milieu sont reliés au coefficient de diffusion translationnelle par la loi de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad [19]$$

où T est la température et k la constante de Boltzmann.

5.2.2 Préparation des échantillons et paramètres utilisés

Les échantillons contiennent des concentrations variables en osmolytes dissous dans du tampon KP 100% D_2O sans ou avec 1 mM de folate, DHF, NADPH et NADP^+ . L'utilisation

du D₂O nous permet de déterminer le coefficient de diffusion translationnel de l'eau en travaillant sur le résiduel de l'eau.

Les expériences RMN ont été enregistrées à 293K et 306,4K sur un spectromètre Bruker Avance 500 équipé avec une sonde BBO (Broad Band Observed). Les spectres ont généralement été enregistrés en 8 scans. La fenêtre spectrale est de 18 ppm, la porteuse a été fixée à la fréquence de résonance de l'eau. Une matrice de $16k(t_2) \times 16(t_1)$ points a été acquise. Le délai d_1 pour le retour à l'équilibre du système est de 4 s. Il est nécessaire de régler la durée de l'impulsion gradient et la durée d'évolution entre les deux impulsions gradient afin d'avoir un échantillonnage adéquat de la courbe. Pour ceci, la durée entre les deux impulsions gradient Δ a été fixée à 50 ms tandis que les durées des impulsions gradient δ sont de 1,6 et 3,2 ms pour respectivement mesurer la diffusion de l'eau et des ligands de la DHFR. L'amplitude des gradients est variable de 2 Gs/cm à 95 Gs/cm. Des irradiations sélectives ont été appliquées à la(aux) résonance(s) des protons des osmolytes pour mesurer les coefficients de diffusion translationnelle des ligands en présence de fortes concentrations en soluté.

Les spectres ont été traités et visualisés avec le logiciel Topspin. Le module *T1/T2 Relaxation* permet d'extraire aisément les valeurs de coefficients de diffusion en sélectionnant un signal sur le spectre 1D ¹H où les signaux sont les plus intenses. Ce spectre correspond au point pour lequel la puissance du gradient la moins importante où la refocalisation des spins est la plus efficace. L'intensité du pic sélectionné est ensuite mesurée automatiquement sur la série de spectre 1D ¹H puis la courbe résultante est ajustée suivant la relation [18] permettant de déterminer le coefficient D . Nous avons sélectionné plusieurs pics de résonance et fait une moyenne des valeurs de D obtenues.

5.3 Les expériences de transfert d'aimantation

5.3.1 Détermination du régime d'échange et des résonances du ligand lié

Dans tous les cas il est nécessaire au préalable, de déterminer le régime d'échange de l'interaction protéine-ligand étudiée : rapide, intermédiaire ou lente à l'échelle de temps des déplacements chimiques. Pour ceci il faut caractériser les régions du spectre qui sont modifiées avec l'ajout du ligand, ce sont celles qui subissent de l'échange et qui nous permettent d'identifier le régime de l'échange. Un schéma des résonances d'un proton en interconversion entre deux états A et B est représenté ci-dessous. Ces états peuvent être caractéristiques de la fixation réversible d'un ligand ou d'un échange conformationnel.

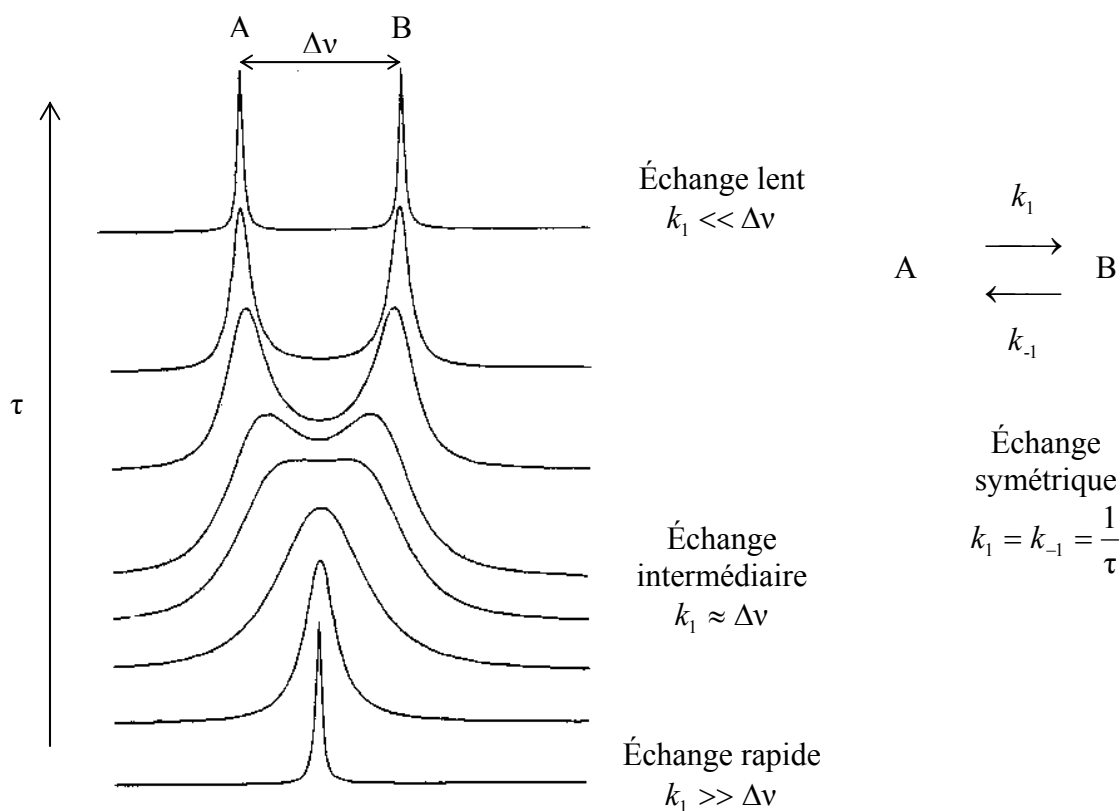


Figure 22 : Schéma d'une résonance d'un proton en échange entre deux états A et B dans différents régimes d'échanges.

Lorsque l'échange entre les états libre et lié de ce ligand est relativement lent à l'échelle de temps des déplacements chimiques, on observe deux jeux de signaux du ligand sur le spectre RMN (Figure 22). Un jeu avec des raies fines correspondant aux résonances du ligand libre et l'autre avec des raies larges qui correspond au ligand lié. Si les résonances du ligand libre sont directement observables lorsque l'on se place en excès de ligand, il est difficile d'identifier les résonances des protons du ligand lié à cause du recouvrement des signaux avec le spectre ^1H de la protéine. Des expériences RMN permettent d'identifier les déplacements chimiques du ligand lié à la protéine et de mesurer la cinétique de l'échange lors d'un échange lent ; ce sont les expériences de transfert de saturation (176).

5.3.2 Les expériences de transfert de saturation

La RMN est une technique très puissante pour caractériser à l'échelle de l'atome, les interactions protéine-ligand et pour identifier de nouvelles molécules bioactives. En effet, de nombreux paramètres RMN peuvent servir à définir une interaction. En pratique, seuls les paramètres que l'on peut obtenir aisément, avec une grande sensibilité sont utilisés. Par

exemple, comme précédemment énoncé, les modifications de déplacement chimique, mais aussi les variations de temps de relaxation, de constante de diffusion, d'intensités de pics NOE ou les échanges de saturation sont autant d'informations permettant de décrire qualitativement mais aussi quantitativement une interaction. Il est possible de déterminer des constantes d'affinité (K_d), des paramètres cinétiques comme la constante cinétique de dissociation k_{off} d'un ligand pour un récepteur, et d'obtenir des informations structurales *via* une série d'expériences NOE (176). Ces expériences impliquent un transfert d'aimantation, voici quelques exemples d'approches expérimentales complémentaires.

Dans le cas d'un échange rapide entre la forme libre et la forme complexée plusieurs méthodes sont utilisées qui font intervenir un excès de ligand. La mesure du transfert est réalisée au travers des variations des intensités des signaux du ligand libre qui sont visualisées sur des spectres différences.

- Les expériences de NOE transféré sont largement utilisées pour déterminer les structures d'un ligand lié à un récepteur. Les changements de polarisation des protons du ligand lié résultant de NOE intra- et inter-moléculaire sont transférés au ligand libre lors de l'échange du ligand lié en ligand libre. En pratique, les petites molécules ($M < 1000$ à 2000 Da) ont des NOE positifs, aucun NOE ou de faibles NOE négatifs selon leur poids moléculaire, leur forme et le champ magnétique B_0 . Des molécules plus grandes comme les protéines ont des NOE intenses négatifs. Si une molécule de petite taille se fixe sur une protéine alors ses NOE seront intenses et négatifs, ce sont des NOE transférés. Ils reflètent la conformation du ligand lié à la protéine et témoignent de la fixation d'un ligand sur un récepteur (177, 178).

- Dans l'expérience de STD (*Saturation Transfer Difference*) (176), une irradiation relativement longue (~ 2 s) est appliquée sur les protons de la protéine, préférentiellement les groupes méthyles. De par la proximité de certains protons du ligand avec la protéine, cette irradiation va se transférer au ligand *via* le phénomène de diffusion de spin. Le transfert d'aimantation est d'autant plus efficace pour les protons du ligand qui sont proches de ceux de la protéine, on pourra par conséquent déterminer si une molécule est ligand d'une protéine, identifier son site de fixation voire orienter le ligand dans son site.

- L'expérience de Water-LOGSY (*Water-Ligand Observation with Gradient Spectroscopy*) est une variante des expériences de transfert de saturation qui utilise l'eau liée à l'interface protéine-ligand. Elle utilise les molécules d'eau liées entre un ligand lié et la protéine pour détecter une interaction. La saturation est donc appliquée à la fréquence de résonance de l'eau. Pour avoir une meilleure sensibilité, les échantillons contiennent le moins de D_2O

possible et cette expérience est particulièrement efficace si le ligand ou le récepteur sont très hydratés comme les complexe ARN-ligand (179, 180).

Les expériences de transfert de saturation peuvent être effectuées d'une manière différente lorsque l'échange est lent sur l'échelle des déplacements chimiques et que la quantité de protéine (de masse moléculaire pas trop élevée) n'est pas un facteur limitant. Celle utilisée lors de ma thèse se base sur des irradiations des signaux du ligand suffisamment courtes pour éviter la diffusion de spin et permet d'obtenir des constantes cinétiques de dissociation. Les détails de cette méthode utilisée sont décrits ci-dessous.

Si l'on sature la résonance d'un proton du ligand à l'état libre, la saturation est transmise à l'état lié par le processus d'échange représenté sur la Figure 23. On observera une décroissance de l'intensité de la résonance de l'état lié : c'est le phénomène de transfert de saturation.

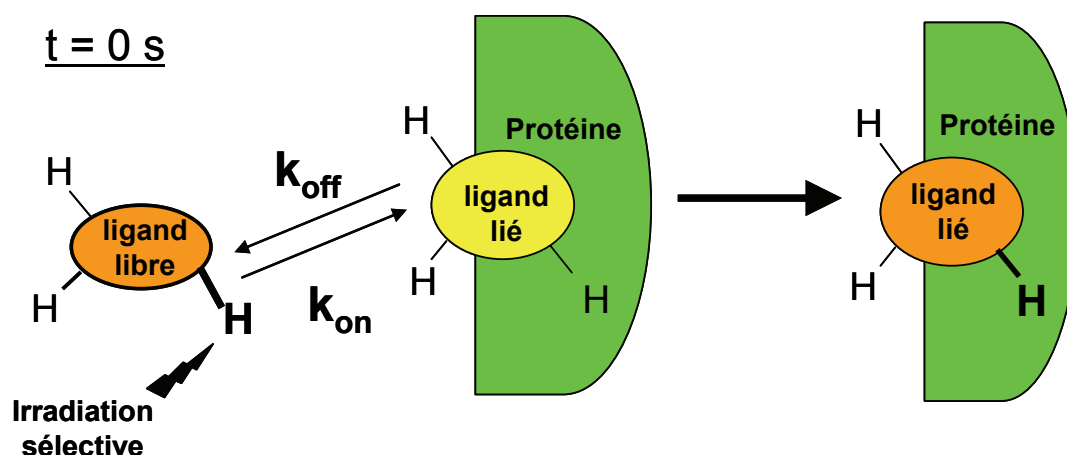


Figure 23 : Représentation schématique du phénomène de transfert de saturation lors de l'irradiation d'un proton du ligand libre.

En pratique, lors des expériences de transfert de saturation, des irradiations sélectives sont appliquées sur un pic du ligand libre avec une puissance suffisante pour saturer 100% du signal (Figure 24). Ces irradiations sont alternativement à la fréquence d'une résonance du ligand libre (*on resonance*) et à une fréquence hors résonance (*off resonance*). L'irradiation hors résonance est successivement appliquée à une extrémité puis à l'autre extrémité du spectre afin de limiter les artefacts sur les spectres de différence.

Lorsque l'on soustrait des spectres 1D ^1H avec l'irradiation *off resonance*, ceux avec l'irradiation *on resonance*, on obtient le spectre différence où il reste deux pics : le pic du proton du ligand libre à la fréquence d'irradiation *on resonance* et celui du même proton du ligand lié qui apparaît par transfert de la saturation de l'état libre vers l'état lié. L'intensité du pic du proton du ligand lié dépend directement du temps d'irradiation et du k_{off} du ligand étudié. Il est, par conséquent, possible de déterminer les déplacements chimiques des protons d'un ligand lié à une protéine.

De plus, en mesurant l'intensité du pic du proton lié en fonction du temps d'irradiation, il est possible de déterminer le k_{off} du ligand étudié. La théorie qui permet d'extraire les k_{off} d'un ligand à partir du transfert de saturation est décrite dans la partie suivante.

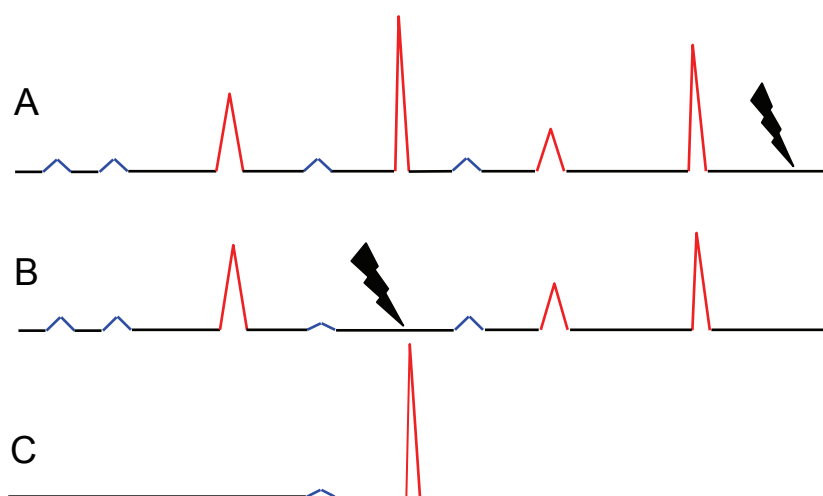
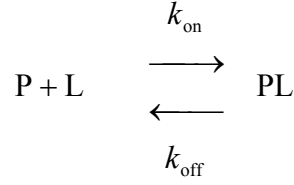


Figure 24 : Schéma de spectres 1D ^1H RMN d'un complexe protéine-ligand, (A) avec une irradiation *off resonance*, (B) avec une irradiation sur un pic du ligand libre, (C) spectre différence des spectres (A) et (B). Les pics de corrélation du ligand libre sont en rouges et les pics du ligand lié sont en bleu.

Afin d'exclure la diffusion de spin et vérifier la sélectivité importante de l'effet étudié : l'irradiation du pic lié doit conduire à la décroissance d'un seul pic libre, ce qui exclut le mécanisme de diffusion de spin aspécifique.

5.3.3 Mesure de constantes cinétiques de dissociation (k_{off} ou k_{-1})

Il est possible d'utiliser l'expérience de transfert de saturation pour déterminer des constantes cinétiques de dissociation car l'intensité d'une résonance d'un ligand dans un état est fonction de la durée d'irradiation sur l'autre état. De manière simplifiée, la fixation d'un petit ligand sur une protéine est une réaction d'association bimoléculaire du second ordre. Ainsi l'association d'un ligand L à un récepteur P donne le complexe PL suivant l'équation :



k_{on} et k_{off} sont respectivement les constantes cinétiques d'association et de dissociation.

Dans un cas général d'interconversion entre deux espèces, l'équation de Bloch décrivant la variation au cours du temps de l'aimantation selon l'axe z pour l'état A (M_z^A), pour une molécule en échange entre deux états A (lié) et B (libre) est reportée ci dessous :

$$\frac{d(M_z^A)}{dt} = -\frac{M_z^A - M_0^A}{T_1^A} - \frac{M_0^A}{\tau_A} + \frac{M_z^B}{\tau_B} \quad [20]$$

avec M_0^A l'aimantation du ligand lié sans irradiation, T_1^A le temps de relaxation longitudinale dans l'état A, M_z^B l'aimantation selon l'axe z pour l'état B et avec

$$\tau_A = \frac{1}{k_{\text{on}}} \quad \text{et} \quad \tau_B = \frac{1}{k_{\text{off}}} \quad [21]$$

La mesure de la modification d'intensité de l'état lié après saturation complète de l'état libre permet de calculer la constante cinétique k_{on} si le temps de relaxation T_1^A est connu. Une étude récente propose d'améliorer ce calcul en permettant d'obtenir des valeurs plus précises de k_{on} sans connaître au préalable T_1^A et M_0^A (181). L'intensité du signal du pic lié en fonction de la durée de saturation sur le pic libre est mesurée et ajustée en utilisant l'équation suivante :

$$\frac{M_0^A - M_t^A}{M_0^A - M_\infty^A} = 1 - e^{-\frac{t}{T_1^{\text{app}}}} \quad [22]$$

où M_∞^A est l'aimantation observée du ligand lié après un long temps d'irradiation de l'état libre (temps « infini »), T_1^{app} est le temps de relaxation apparent du ligand lié et t désigne le temps d'irradiation.

On peut ainsi obtenir les paramètres M_∞^A et T_1^{app} . Comme la vitesse de relaxation apparente,

$\frac{1}{T_1^{\text{app}}}$, correspond à la somme des vitesses responsables de la disparition du signal, on obtient :

$$\frac{1}{T_1^{\text{app}}} = \frac{1}{T_1^A} + k_{\text{off}} \quad [23]$$

5.3.4 Échantillons utilisés et paramètres des expériences de transfert de saturation

Les conditions optimales pour faire des mesures de k_{off} par transfert de saturation correspondent à des conditions d'échange lent à l'échelle des déplacements chimiques, mais suffisamment rapide par rapport au temps de relaxation longitudinal des protons du ligand. Les jeux de signaux entre les états libres et liés sont alors résolus et le transfert de saturation est suffisamment efficace pour pouvoir mesurer des différences d'intensités du pic non irradié pour des temps d'irradiation courts. Il est donc judicieux de faire des mesures de k_{off} à plusieurs températures pour trouver les conditions optimales d'étude.

Les ligands de la DHFR sont en échange lent, par conséquent deux jeux de signaux sont observables : un jeu de raies très fines correspondant aux résonances du ligand libre et un autre avec des raies larges correspondant au ligand lié à la protéine. Les expériences de transfert de saturation ont déjà été utilisées pour étudier les complexes DHFR d'*E. coli* et *L. casei* avec le TMP et les complexes DHFR de *L. casei* avec le NADPH et plusieurs analogues (182-184).

Les conditions d'expériences sont les mêmes que celles des expériences RMN de *chemical shift mapping*. La seule différence est que les échantillons sont préparés avec du tampon KP 100% D₂O. Les expériences de transfert de saturation par différence ont été menées à deux températures 293 K et 306,4 K. De 2048 à 5120 scans ont été accumulés en utilisant 8192 points sur une largeur spectrale de 17 ppm. Avant la transformée de Fourier, le signal de RMN a été multiplié par une fonction exponentielle décroissante.

Pour déterminer les déplacements chimiques des protons du folate et du NADP⁺ liés à la DHFR nous avons utilisé un long pulse d'irradiation (500 ms) de puissance modérée (>70 dB) pour augmenter la sélectivité de l'irradiation. En effet, plus la puissance des pulses est importante et plus la gamme de fréquence irradiée autour de la fréquence d'irradiation est importante.

Les durées d'irradiation suivantes ont été échantillonnées : 10, 30, 60, 90, 120, 240 et 500 ms, pour déterminer le k_{off} du folate et du NADP⁺. Ces durées sont sélectionnées de manière à décrire au mieux le phénomène de transfert de saturation en fonction du temps. La puissance de l'irradiation pour saturer 100% du pic d'un proton des ligands libres, pour ces durées d'irradiations, est comprise entre 55 et 72 dB. Plus la durée d'irradiation est faible et plus la puissance pour saturer le pic du proton libre devra être importante. Les irradiations hors

résonance sont alternativement appliquées à l'extrémité gauche (6000 Hz) puis à l'extrémité droite (−1000 Hz) pour limiter les artefacts sur les spectres. Les intensités du pic de corrélation du proton lié ont été mesurées avec Topspin et l'augmentation de son intensité en fonction du temps d'irradiation a été ajustée avec le logiciel Regressi à partir des relations [22] et [23] pour extraire le k_{off} .

5.4. Étude de la dynamique interne d'une protéine par RMN

Une des possibilités les plus intéressantes offertes par RMN est sa capacité à sonder l'ensemble des mouvements moléculaires sur une gamme de temps très large, à l'échelle atomique. Les spins nucléaires sont extrêmement sensibles à leur environnement local et leur relaxation s'étale sur une gamme de fréquence importante qui traduit les mouvements des macromolécules. Avec le marquage isotopique ^{15}N et ^{13}C des protéines, les études de dynamique se sont multipliées afin de comprendre la relation entre la structure, la dynamique et la fonction des protéines. Le signal détecté en solution par RMN est décroissant. Il correspond au retour du système vers l'équilibre thermodynamique après excitation : c'est le phénomène de relaxation. La dynamique interne des protéines est étudiée principalement à partir de la relaxation des spins nucléaires ^{15}N et ^{13}C qui portent un seul proton. Les informations sont obtenues en mesurant 3 paramètres expérimentaux : les temps de relaxation longitudinale T_1 et transversale T_2 , et la relaxation croisée NOE (151, 185-188).

5.4.1 Les mouvements moléculaires

Les protéines en solution ne sont pas des entités rigides animées uniquement de mouvements de diffusion rotationnelle et translationnelle, elles possèdent des mouvements moléculaires (Figure 25 : Échelle de temps des mouvements moléculaires qui peuvent être étudiés par RMN. (188) Les mouvements de faibles amplitudes sont extrêmement rapides (ps–ns) et nécessitent peu d'énergie, ils correspondent aux mouvements vibrationnels des liaisons atomiques qui disposent d'une liberté de mouvement autour de leurs orientations moyennes. À l'inverse, les mouvements de grandes amplitudes (μs–ms) sont plus lents et plus coûteux en énergie. Les boucles sont souvent animées d'une dynamique d'échange lente entre plusieurs conformations et les noyaux portés par ces boucles peuvent ainsi résonner à différentes fréquences (189).

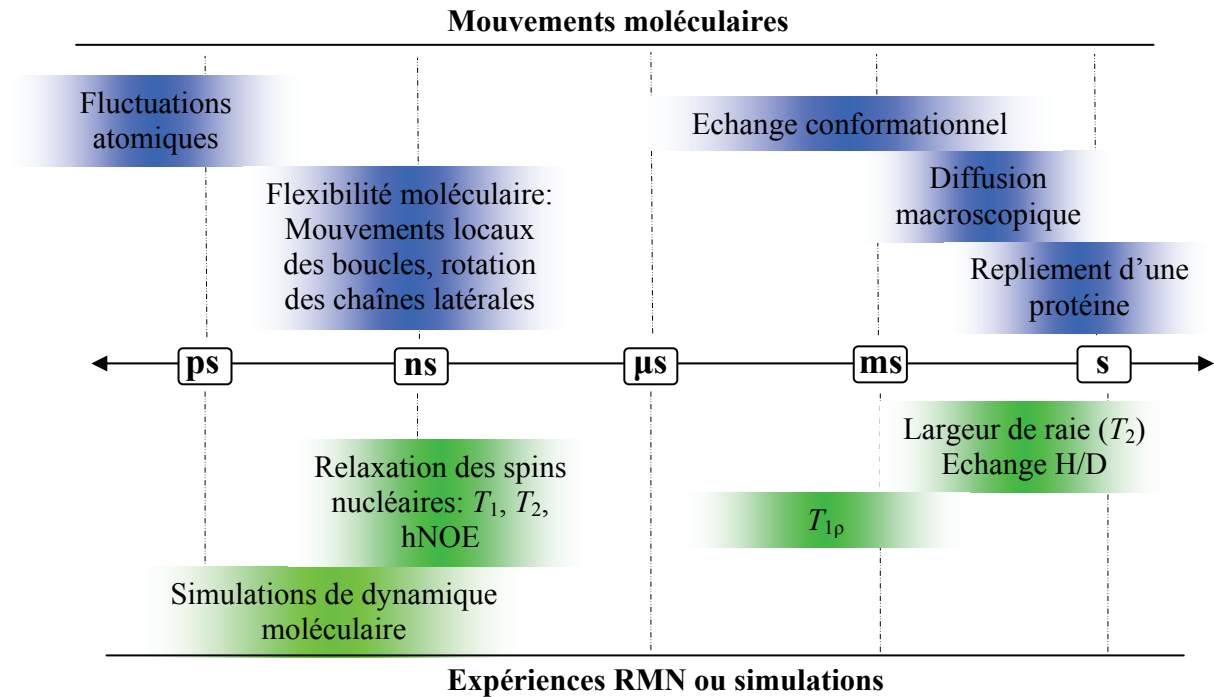


Figure 25 : Échelle de temps des mouvements moléculaires qui peuvent être étudiés par RMN. (188)

5.4.2 La fonction densité spectrale

Les mouvements macromoléculaires provoquent des réorientations des vecteurs XH. La fonction d'autocorrélation $C(t)$ permet de décrire la variation angulaire des vecteurs XH de la molécule au temps t par rapport au temps $t = 0$. Si on considère la protéine comme une sphère rigide avec un mouvement brownien isotrope, la fonction d'autocorrélation est une exponentielle décroissante en fonction du temps (190) :

$$C(t) = \frac{1}{5} e^{-\frac{t}{\tau_c}} \quad [24]$$

où τ_c est le temps de corrélation d'un vecteur XH.

La transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation s'appelle la fonction de densité spectrale :

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} \right] \quad [25]$$

où ω correspond à la fréquence de Larmor du noyau considéré ^{15}N ou ^{13}C .

5.4.3 Le phénomène de relaxation

Si on perturbe le système avec une impulsion, il va revenir à l'équilibre *via* le processus de relaxation. Le temps que met l'aimantation macroscopique à revenir à l'équilibre va dépendre de la capacité de chaque spin à dissiper son excès d'énergie avec l'environnement. Les mouvements nucléaires induisent des fluctuations des champs magnétiques locaux par déplacement des électrons situés dans les orbitales moléculaires. En solution, la vitesse de ces fluctuations dépend de la diffusion rotationnelle et des mouvements internes de la protéine. La relaxation nucléaire en solution est donc toujours intrinsèquement dépendante de la dynamique de chaque noyau, de la mobilité de chaque résidu (186, 191).

Deux temps de relaxation peuvent être définis :

La relaxation longitudinale ou relaxation spin-réseau est liée aux échanges d'énergie entre les spins et leur environnement. Elle est caractérisée par le temps de relaxation longitudinale T_1 , que met l'aimantation M_z pour revenir à des conditions d'équilibre le long de l'axe z . Cette relaxation est favorisée par des fluctuations de champ magnétique à haute fréquence ($\omega \sim \omega_0$). Le temps de relaxation longitudinal T_1 est donc minimum pour $\tau_c = 1/\omega_0$ (Figure 26).

La relaxation transversale ou encore relaxation "spin-spin" décrit le retour à zéro de la composante M_{xy} de \vec{M} dans le plan O_{xy} perpendiculaire au champ magnétique B_0 . Le temps de relaxation longitudinal T_2 est lié au déphasage des aimantations nucléaires sous l'effet de fluctuations du champ local à toutes les fréquences : les mouvements lents y contribuent aussi bien que les mouvements haute fréquence. T_2 est toujours inférieur à T_1 puisqu'un grand nombre de phénomènes contribuent au T_2 . La courbe décrivant les variations de T_2 en fonction de τ_c est décroissante, indiquant que la relaxation est d'autant plus efficace que les mouvements sont lents (Figure 26). On définit les vitesses de relaxation R_1 et R_2 par $R = 1/T$.

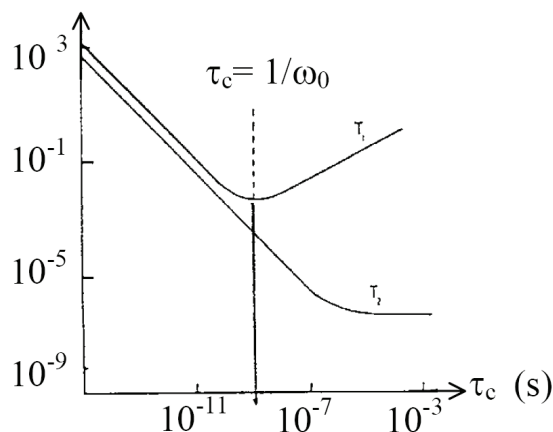


Figure 26 : Variation de T_1 et T_2 en fonction du temps de corrélation τ_c .

Il existe un autre type de relaxation appelé l'effet Overhauser nucléaire (NOE). Cet effet se traduit par un transfert d'aimantation d'un spin I vers un spin S sous l'effet de leur couplage dipolaire. Cet effet est détectable uniquement si la distance entre les atomes est en général inférieure à 6 Å et est utilisé pour la détermination de structures tridimensionnelles par RMN.

5.4.3.1 Mesure des paramètres R_1 et R_2

Pour mesurer les paramètres de relaxation T_1 ($R_1 = 1/T_1$) ou T_2 ($R_2 = 1/T_2$), les séquences d'impulsions utilisées sont celles décrites par Farrow et collaborateurs (192) lors de l'étude de la dynamique interne de l'ubiquitine.

Des séries d'expériences ^{15}N -HSQC sont enregistrées en faisant varier le délai de relaxation t_r . Les intensités des pics de corrélation sont alors modulées par le délai de relaxation en accord avec les propriétés de relaxation de chaque noyau ^{15}N . Les expériences typiques pour mesurer les temps de relaxation T_1 et T_2 contiennent des modules INEPT et INEPT-inverse pour transférer l'aimantation du ^1H vers ^{15}N au début de la séquence, puis retransférer l'aimantation vers le ^1H à la fin de l'expérience juste avant la détection. Lors des expériences pour mesurer T_1 , l'aimantation ^{15}N est basculée le long de l'axe z , pendant le délai t_r où chaque noyau individuel relaxe. L'intensité du signal enregistré va dépendre de la vitesse de relaxation ^{15}N : R_1 . Lors de l'expérience pour mesurer T_2 , l'aimantation ^{15}N n'est pas basculée sur l'axe z , et les spins relaxent dans le plan x,y pendant le délai t_r . L'intensité des pics de corrélation sera fonction de la vitesse de relaxation R_2 de chaque noyau. Une série d'impulsions est appliquée sur les noyaux ^1H et ^{15}N pendant le délai t_r , permettant d'éliminer les effets de relaxation croisée dipôle-dipôle.

Une série d'expérience est enregistrée en faisant varier le délai t_r afin d'échantillonner au mieux la courbe de relaxation. Certains délais de relaxation ont été enregistrés deux fois, afin d'évaluer l'erreur sur les mesures. On obtient donc un spectre ^{15}N -HSQC pour chaque délai de relaxation t_r . L'intensité des pics de corrélation H-N décroît de manière exponentielle suivant la relation [26] et tend vers zéro quand le délai de relaxation tend vers l'infini.

$$I(t_r) = I_0 e^{-Rt_r} \quad [26]$$

où $I(t_r)$ est l'intensité du pic croisé pour le délai de relaxation t_r , I_0 est l'intensité pour le délai $t_r = 0$ et R est la vitesse de relaxation (R_1 ou R_2).

L'optimisation des valeurs de I_0 et R est obtenue en minimisant la fonction cible χ^2 dont l'expression est la suivante :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(I(t_r)_{\text{calc}} - I(t_r)_{\text{exp}})^2}{\sigma_i^2} \quad [27]$$

où $I(t_r)_{\text{calc}}$ et $I(t_r)_{\text{exp}}$ sont respectivement les intensités des pics calculées et mesurées, σ_i correspond à l'incertitude de mesure sur l'intensité du pic. Plus la valeur de χ^2 est faible, plus la correspondance entre le modèle et les valeurs expérimentales est correcte. Les incertitudes sur les valeurs des paramètres de relaxation R_1 et R_2 sont évaluées grâce à la méthode de Monte Carlo (193). Les intensités calculées sont perturbées aléatoirement selon une distribution normale avec un écart type correspondant à celui de l'erreur sur la mesure. Comme pour toute analyse statistique, il est indiqué d'avoir un échantillonnage le plus vaste possible. Cela nous permet d'obtenir une valeur moyenne des vitesses de relaxation ainsi qu'un écart type.

5.4.3.2 Mesure de l'effet NOE

La mesure de la relaxation croisée ou effet NOE est réalisée à l'aide de deux expériences ^{15}N -HSQC : une avec saturation des protons amides et l'autre sans. Les valeurs des NOE hétéronucléaires ^1H - ^{15}N sont déterminées à partir de l'équation :

$$\text{NOE} = \frac{I_{\text{irr}}}{I_{\text{ref}}} \quad [28]$$

où I_{irr} et I_{ref} sont respectivement les intensités des pics croisés avec et sans irradiation (la référence).

La saturation des protons amides est assurée par un train d'impulsion pendant le délai d'équilibrage d_1 qui rompt l'équilibre, le système se trouve alors à l'état stationnaire. On regarde ensuite l'effet de cette perturbation sur l'aimantation longitudinale du spin ^{15}N . De plus, les deux expériences sont enregistrées de manière enchevêtrée afin que les conditions soient aussi proches que possibles (dérive du shim, température,...).

On note que la qualité des spectres enregistrés est moins bonne que celle des spectres obtenus lors des expériences de relaxation ^{15}N car la sensibilité de l'expérience NOE hétéronucléaire est plus faible. En effet, il n'y a pas de transfert de polarisation du ^1H vers le ^{15}N au début de la séquence.

5.4.3.3 L'échange chimique

La notion d'échange a précédemment été abordée dans la description des expériences de transfert de saturation dans le cas de la fixation d'un ligand sur une protéine. Ce phénomène est également observable lors de l'oscillation de résidus entre deux sites à l'échelle de la microseconde à la milliseconde. Il se traduit expérimentalement par une valeur élevée de la vitesse de relaxation transversale apparente R_2^{app} avec l'introduction d'un terme d'échange R_{ex} tel que :

$$R_2^{\text{app}} = R_2 + R_{\text{ex}} \quad [29]$$

où R_2 est la vitesse de relaxation transversale réelle et

$$R_{\text{ex}} = \frac{4\pi^2 \Delta\nu^2 \rho_A \rho_B \tau_{\text{ex}}}{1 + \omega^2 \tau_{\text{ex}}^2}, \quad [30]$$

dans le cas d'un échange chimique entre deux états A et B, de populations ρ_A et ρ_B , dont les fréquences de résonances sont respectivement ν_A et ν_B . $\Delta\nu$ est la différence de fréquence entre ν_A et ν_B , et τ_{ex} est lié aux constantes cinétiques de vitesse d'échange k_1 et k_{-1} entre ces deux états tel que $\tau_{\text{ex}} = (k_1 + k_{-1})^{-1}$.

5.4.3.4 La mesure des paramètres de relaxation de la DHFR en présence d'osmolytes

Le complexe ternaire DHFR:Folate:NADP⁺ de conformation *closed* a été formé de la même manière que lors des expériences de RMN précédentes. Les ligands sont toujours six fois en excès par rapport à la concentration protéique. Les expériences de dynamique ont été menées à 306,4 K sur un spectromètre RMN Bruker Avance 500 équipé d'une cryosonde. Les spectres ont été enregistrés en mode phasé en F1 en utilisant le mode de sélection des gradients *Echo anti-Echo* et sont composés d'une matrice de $2048(t_2) \times 256(t_1)$ points. Les porteuses ^1H et ^{15}N sont positionnées au déplacement chimique de l'eau (4,70 ppm) et à 118 ppm. Les déplacements chimiques sont toujours calibrés par rapport au triméthylsilyl propionate (TSP). Les largeurs spectrales sont de 16 ppm et 32 ppm pour les noyaux ^1H et ^{15}N , respectivement. Les expériences R_1 et R_2 ont été enregistrées en 16 scans tandis que 24 scans ont été accumulés pour les expériences NOE qui sont moins sensibles. Le délai de relaxation est de 3 s pour les expériences R_1 et R_2 , et 5 s pour l'expérience NOE. Neuf temps de relaxation ont été échantillonnés lors des expériences de relaxation transversale : 17, 34, 51, 85, 119, 153, 187, 221 et 238 ms ; les mesures pour des temps de relaxation de 17 et 85

ms ont été doublées. Lors les expériences de relaxation longitudinales, dix délais ont été choisis : 10, 50, 100, 200, 400, 700, 1000, 1500, 2000 et 3000 ms ; les points à 50, 400 et 700 ms ont été doublés. Pour les expériences NOE hétéronucléaire, deux spectres ont été enregistrés un avec et l'autre sans présaturation des protons amides. Les spectres ont été enregistrés de manière enchevêtrés pour minimiser les erreurs systématiques entre les deux spectres. L'expérience NOE a été reproduite une fois pour obtenir une paire de spectres. Tous les spectres ont été traités de manière identique avec NMRPipe/NMRDraw et visualisés avec NMRView sur une station Linux. Les spectres ont subi un *zéro filling* dans les deux dimensions, après une apodisation cosinus carré et une prédiction linéaire en F1.

Le module *Rate Analysis*, du logiciel NMRview, a été utilisé afin d'extraire les paramètres R_1 et R_2 de l'équation [26] à partir des jeux de données expérimentales. Ce module permet de faire une analyse rapide des paramètres de relaxation d'une protéine puisque la liste des pics du spectre le plus intense (avec le délai le plus court) suffit pour mesurer les intensités des pics des autres spectres d'une même série. L'intégration des intensités des pics de corrélation en mode « Jitter » autorise de faibles variations de déplacement chimique des pics au sein de la série de spectres contrairement à l'intégration en modes « volume » ou « intensité ». Le nombre maximal de simulations de Monte Carlo proposé par notre version de NMRView a été sélectionné, soit 800 par vitesse de relaxation avec un intervalle de confiance de 65 %. L'effet NOE a été mesuré de manière automatique à l'aide du module HetNOE du logiciel NMRView sur deux spectres, un avec irradiation et l'autre sans, à partir de la relation [28].

5.4.4 Des paramètres de relaxation aux mouvements moléculaires

Les équations reliant la fonction densité spectrale aux paramètres de relaxation ont été précédemment décrites par Abragam en 1961 (190). De nombreuses approches théoriques ont été proposées pour modéliser la fonction densité spectrale à partir des données de relaxation R_1 , R_2 et NOE. Les paramètres dynamiques ont été déterminés à l'aide de l'approche model-free développée par Lipari et Szabo (194, 195) qui traite la diffusion rotationnelle globale de la macromolécule séparément des mouvements internes plus rapides. Je ne vais présenter que l'analyse model-free qui est actuellement l'approche la plus utilisée.

5.4.4.1 Le modèle de Lipari-Szabo

L'approche de ce modèle consiste à réduire les mouvements des vecteurs \overrightarrow{XH} d'une protéine à deux types de mouvements : la diffusion rotationnelle globale de la macromolécule et les mouvements internes locaux. Il est possible de considérer ces mouvements de manière indépendante car leur échelle de temps est différente d'au moins un ordre de grandeur. On a vu dans l'introduction bibliographique, par exemple, que la DHFR est caractérisée par un temps de corrélation global τ_c d'environ 9 ns tandis que certains résidus dans les boucles ont des mouvements internes τ_e de 1 à 2 ns.

La protéine est tout d'abord considérée comme une sphère rigide animée d'un mouvement de rotation global isotrope caractérisé par le temps de corrélation global τ_c . Dans ce cas, le rapport R_2/R_1 est indépendant des mouvements internes et permet de déterminer le temps de corrélation global τ_c de la molécule (196).

En l'absence de mouvements internes et d'échange conformationnel, la fonction densité spectrale peut s'écrire simplement :

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} \right] \quad [31]$$

Si l'on prend en compte ensuite les mouvements internes, en considérant le paramètre d'ordre généralisé S^2 et le temps de corrélation interne τ_e , la fonction d'autocorrélation $C(t)$ qui décrit l'ensemble des mouvements de la protéine est alors la multiplication de deux fonctions, l'une caractérisant le mouvement global de la molécule $C_c(t)$ et l'autre les mouvements internes $C_e(t)$:

$$C(t) = C_c(t) \times C_e(t) \quad [32]$$

$$\text{avec} \quad C_c(t) = \frac{1}{5} e^{-\frac{t}{\tau_c}} \quad \text{et} \quad C_e(t) = S^2 + (1 - S^2) e^{-\frac{t}{\tau_e}}. \quad [33]$$

On remarque que quand t tend vers l'infini, $C_e(t)$ tend vers le paramètre d'ordre généralisé S^2 . Ce paramètre reflète l'amplitude des mouvements internes. Quand S^2 est nul, le vecteur \overrightarrow{XH} n'a aucune orientation préférentielle. Si au contraire, S^2 tend vers 1, la liberté de mouvement du vecteur \overrightarrow{XH} est quasi nulle, son orientation est fortement restreinte.

La transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation $C(t)$ est la fonction de densité spectrale, elle est le résultat de la somme de deux lorentziennes :

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + (\omega \tau_c)^2} \right] \text{ avec } \tau = \frac{\tau_c \tau_e}{\tau_c + \tau_e} \quad [34]$$

Cependant, lors d'études sur la nucléase de staphylocoque et l'interleukine-1 β , Clore et ses collaborateurs ont remarqué que le modèle de Lipari et Szabo ne reproduisait pas les mouvements de certains acides aminés (197, 198). Ils ont alors proposé un modèle étendu du « model-free » de Lipari-Szabo.

5.4.4.2 Le modèle de Lipari-Szabo étendu

Dans ce modèle, un troisième temps de corrélation et un second paramètre d'ordre ont été ajoutés pour décrire les mouvements internes intermédiaires. Les mouvements internes sont décrits sur deux échelles de temps distinctes, avec deux temps de corrélation τ_f et τ_s et deux paramètres d'ordre S_f^2 et S_s^2 . La fonction densité spectrale caractérisant l'ensemble des mouvements moléculaires de la molécule devient alors la somme de trois lorentziennes :

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S_f^2 S_s^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} + \frac{S_f^2 (1 - S_s^2) \tau'_s}{1 + (\omega \tau'_s)^2} + \frac{(1 - S_f^2) \tau'_f}{1 + (\omega \tau'_f)^2} \right] \quad [35]$$

$$\text{avec } \tau'_f = \frac{\tau_c \tau_f}{\tau_c + \tau_f} \text{ et } \tau'_s = \frac{\tau_c \tau_s}{\tau_c + \tau_s} \quad [36]$$

Les paramètres S^2 , τ_e et τ_c du modèle de Lipari-Szabo et ceux du modèle de Lipari-Szabo étendu S_f^2 , S_s^2 , τ_s et τ_c sont ajustés à l'aide des mesures de relaxation R_1 , R_2 et NOE. Il est nécessaire de déterminer au préalable le temps de corrélation global de la protéine pour faciliter l'ajustement des paramètres de relaxation.

5.4.4.3 Détermination du temps de corrélation τ_c

Le temps de corrélation τ_c est le temps moyen nécessaire pour qu'une molécule se réoriente d'un radian. Il est possible de déterminer τ_c directement à partir des rapports R_2/R_1 des résidus

dont les vecteurs XH présentent une mobilité interne réduite et pas de phénomène d'échange (198). Ces résidus sont pour la plupart localisée dans des structures secondaires.

Nous avons utilisé le logiciel Tensor2 (199, 200) pour modéliser les mouvements caractéristiques des vecteurs NH de la DHFR en présence de différentes concentrations et types d'osmolytes.

5.4.4.4 Le logiciel Tensor2

Le logiciel Tensor2 permet de déterminer le temps de corrélation des protéines à partir de leurs structures tridimensionnelles et un jeu de paramètres de relaxation (T_1 , T_2 et NOE). Il permet également de faire une analyse model-free de la dynamique interne des protons amides de chaque résidu avec un tenseur de diffusion rotationnelle isotrope ou anisotrope. Dans le cas d'un tenseur anisotrope, le traitement est plus compliqué et il est nécessaire de posséder la structure tridimensionnelle de la protéine pour déterminer le tenseur de diffusion et les paramètres dynamiques. Il existe cinq types de modèles basés sur le formalisme de Lipari-Szabo qui contiennent chacun un nombre de paramètres ajustables différents. La démarche est basée sur le protocole publié par le groupe de Palmer (201) qui ajuste les données à des modèles de plus en plus complexes jusqu'à ce que les données soient reproduites de manière adéquate. L'objectif de cette analyse statistique est de sélectionner le modèle qui modélise le mieux la dynamique du vecteur \overrightarrow{XH} de chaque résidu. Elle consiste à tester chacun des modèles pour chaque vecteur \overrightarrow{XH} en ajustant les paramètres de relaxation. Les modèles sélectionnés doivent reproduire les données expérimentales à $\pm 5\%$, et posséder une faible valeur de la fonction cible χ^2 . Pour trancher entre deux modèles, un test de Fischer-Snedecor (test-F) est effectué pour déterminer si l'ajout d'un paramètre est justifié.

PARTIE III Résultats et discussions

1. Production, purification et contrôle de la DHFR

Il existe, dans la littérature, divers protocoles de purification de la DHFR qui diffèrent suivant la souche bactérienne utilisée comme système de culture, le mode de lyse des cellules, l'éluant, le tampon, etc. La souche bactérienne C41 transformée nous a été généreusement donnée par l'équipe DUALS (Dualité et Universalité de l'Adaptation Lors d'un Stress), le clonage et l'adaptation « locale » du protocole de production et de purification de la DHFR dans le tampon tris-acétate ont été réalisés par S. Renaud.

Quelques mises au point ont été apportées pour l'étude de la DHFR dans notre laboratoire, en considérant que la technique principale de nos travaux est la RMN. Nous avons, tout d'abord, augmenté les volumes de culture jusqu'à 2 L. Ensuite, comme les études sur la DHFR par RMN ont principalement été menées dans du tampon KP (137, 138, 152, 153), nous avons donc substitué le tampon tris acétate par du tampon KP dans le protocole de purification. La première stratégie adoptée était de purifier la protéine dans du tampon tris-acétate pour ensuite changer le tampon par dialyse, cependant des traces de tris acétate sont toujours observables sur les spectres RMN. Par conséquent, il a été nécessaire de n'utiliser que du tampon KP lors des purifications. Ensuite, ne possédant pas de presse de French, nous avons cassé les cellules par sonication après fragilisation des parois bactériennes comme indiqué dans la partie « Matériels et méthodes ». Cette méthode est cependant moins efficace que la presse de French et il faut faire attention à l'échauffement de l'échantillon. Dans la littérature, l'élution est effectuée soit avec du DHF ou du folate, notre protocole initial utilisait du DHF dont le prix est bien plus élevé que le folate. De par nos volumes de culture importants, nous avons donc utilisé le folate comme éluant en ajustant le pH d'élution avec ce ligand. Des échantillons des différentes étapes de purification ont été déposés sur un gel d'acrylamide (Figure 27) pour contrôler le déroulement de chaque étape. La bande de migration de la DHFR ne se situe pas à 18 kDa comme attendu mais à environ 24 kDa d'après le marqueur de taille. Il existe souvent des disparités entre le profil de migration d'une protéine d'intérêt et les poids moléculaires de référence du marqueur de taille. On observe des bandes de migration additionnelles, peu intenses dans les fractions les plus concentrées en protéine, qui correspondent à des poids moléculaires plus importants. Elles ne sont pas observables sur les gels de tous nos cycles de cultures. Il est proposé dans la littérature qu'il s'agisse d'agrégats

réversibles de DHFR induits par l'oxydation des groupements thiols en ponts disulfures puisque l'incubation dans du β -mercaptoéthanol ou la présence de 1 mM de DTT dans le tampon inhibe la formation de ces polymères (128, 202). Cependant pour des fractions très concentrées, il est difficile d'éliminer complètement l'agrégation de la DHFR.

La dernière étape de dialyse classique dans des boudins a également été substituée par une étape de dialyse concentration avec une cellule à agitation Amicon, suivie d'une lyophilisation sur la nuit. Après dissolution dans du tampon KP, les spectres RMN des protéines lyophilisées sont identiques à ceux des protéines dialysées sur la nuit dans des boudins de dialyse.

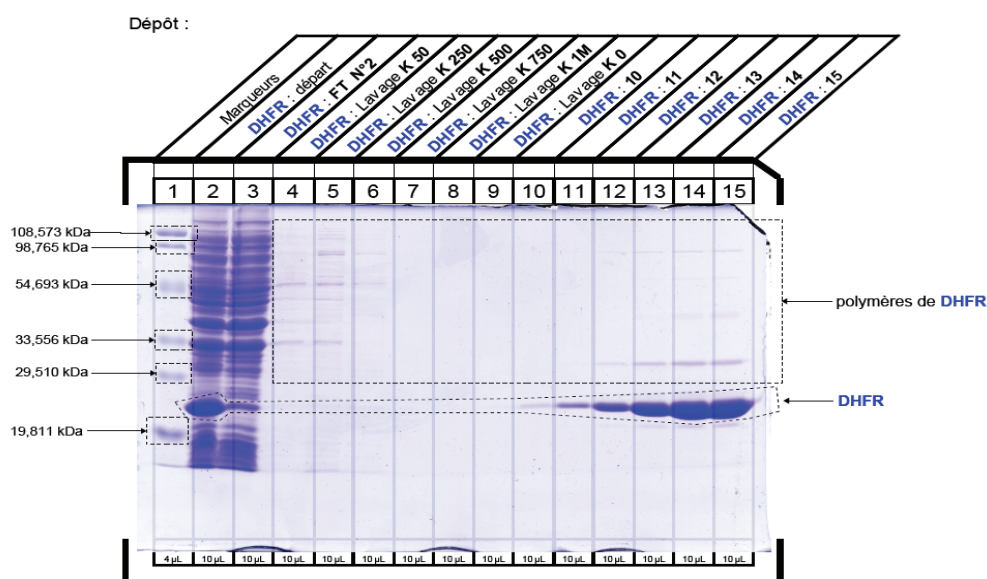


Figure 27 : Profil de migration des échantillons des différentes étapes de la purification sur gel d'acrylamide 12,5% (après 5 min de chauffage à 95°C).

Nous avons obtenu des quantités de protéines compatibles avec une étude par RMN. Le rendement moyen estimé après purification est d'environ 30 mg par litre de culture. Lors du marquage au ^{15}N , les rendements diminuent (~20 mg par litre de culture), principalement à cause de l'utilisation du milieu limitant (M9) pour l'incorporation isotopique. Le taux d'enrichissement a été estimé par RMN à l'aide de séquences d'impulsions ^1H sans et avec découplage à environ 90%.

Nous avons ensuite effectué des mesures d'activité, et enregistré des spectres de dichroïsme circulaire, de fluorescence et RMN de la DHFR dans le tampon KP. Ces données ont été comparées avec celles publiées dans la littérature pour contrôler les caractéristiques de la DHFR produite au laboratoire.

1.1 Mesure de l'activité catalytique de la DHFR

Les mesures de l'activité de la DHFR ont été effectuées avec 0,12 μM de DHFR, 50 μM de DHF et 100 μM de NADPH. Les concentrations de DHFR, DHF et NADPH, contrôlées en spectrométrie visible, ont été choisies afin d'induire une différence d'absorbance importante et une cinétique suffisamment lente pour calculer avec précision la pente à l'origine (

Figure 28).

Cette pente correspond à la vitesse maximale V_{\max} de catalyse de l'enzyme qui permet de calculer ensuite l'activité spécifique. Un excès de protéine induit une cinétique trop rapide et il est possible de manquer la phase de décroissance linéaire. Des quantités de protéines, substrats et cofacteurs trop faibles induiront des différences d'absorbance trop faibles pour être mesurées avec précision.

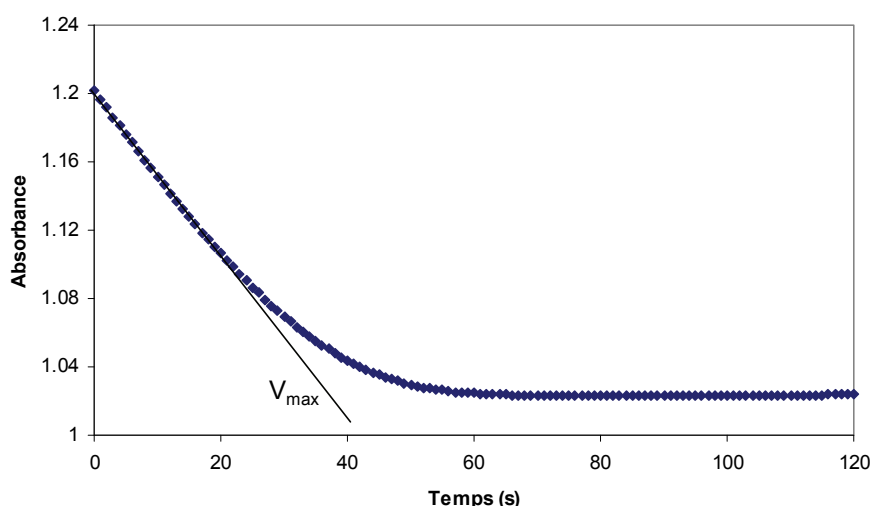


Figure 28 : Suivi de l'activité catalytique de la DHFR dans du tampon KP. Diminution de l'absorbance en fonction du temps ($\lambda = 340 \text{ nm}$).

Il est indispensable d'agiter efficacement la cuve après ajout du NADPH afin d'obtenir des résultats reproductibles. Pour éviter l'effet hystérétique décrit dans la partie bibliographique, nous avons incubé la DHFR pendant 10 min en présence de DHF avant d'ajouter le NADPH pour démarrer la réaction enzymatique.

L'activité spécifique de la DHFR est de $7,6 \pm 0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ dans du tampon tris-acétate et $5,8 \pm 0,3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ dans le tampon KP. On observe une diminution de 25 % de l'activité relative de la DHFR lorsque l'on utilise du tampon KP. Cet effet est en accord avec des études antérieures qui ont démontré que les cations inhibent l'activité de l'enzyme. Cette inhibition est d'autant plus marquée que le rayon de l'ion est important et les ions divalents

sont des inhibiteurs plus efficaces que les cations monovalents alors que les anions n'ont aucun effet sur l'activité de l'enzyme (128).

1.2 Spectres de dichroïsme circulaire et d'émission de fluorescence de la DHFR

Les mesures d'activité de la DHFR étant satisfaisantes, nous avons ensuite vérifié l'intégrité structurale de la DHFR dans du tampon KP par différentes méthodes biophysiques : dichroïsme circulaire, fluorescence et RMN. Le spectre de dichroïsme circulaire (CD) est comparable à ceux publiés dans la littérature (156, 203), typique d'une protéine possédant une structure mixte avec des brins β et des hélices α . On observe un maximum à ~ 196 nm et un minimum à ~ 218 nm (Figure 29).

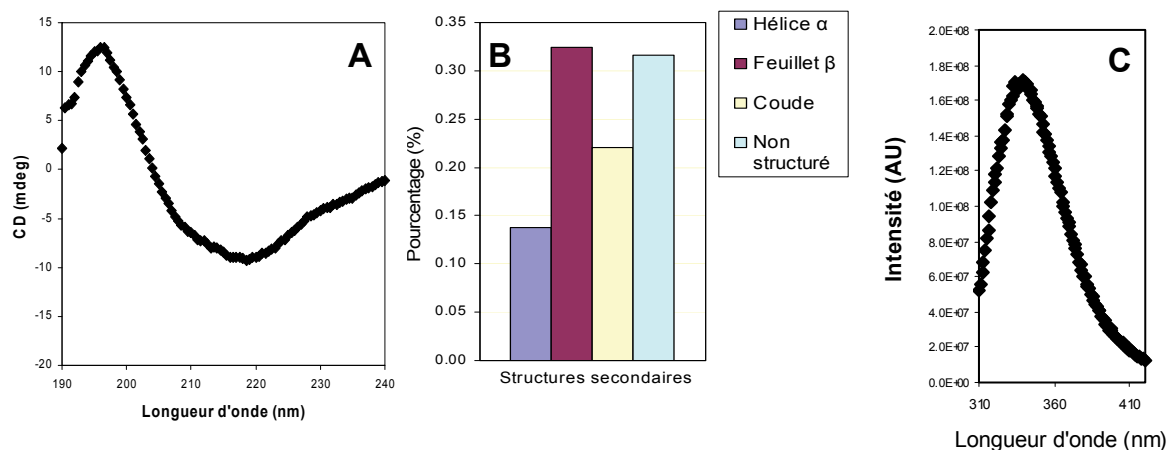


Figure 29 : (A) Spectre de dichroïsme circulaire et (B) taux de structures secondaires après déconvolution. (C) Spectre d'émission de fluorescence.

Par déconvolution du spectre CD, nous avons déterminé le taux de chaque type de structures secondaires de notre protéine afin de le comparer avec les structures cristallographiques déposées dans la PDB (1RX2 ou 1RX7 par exemple). Il a été calculé que 32 % des résidus sont localisés dans des brins β , 14 % sont dans des hélices α et 23 % des acides aminés sont situés dans des coudes. Ces pourcentages sont compatibles avec ceux déterminés à partir de la structure RX de la DHFR où 33% des résidus sont dans les brins β et 26% des résidus sont localisés dans les hélices α . Le pourcentage calculé d'hélice α est inférieur à celui déterminé en analysant la structure cristallographique. Néanmoins, ceci peut s'expliquer car d'une part les structures en solution ont une certaine liberté de mouvement tandis que les structures cristallines sont rigides et hautement organisées. De plus, il a été

observé empiriquement que le taux de résidus structurés en hélice α estimé par déconvolution des spectres CD est souvent inférieur à celui observé dans les structures RX ou RMN (204).

La DHFR possédant cinq tryptophanes, nous avons ensuite enregistré un spectre d'émission de fluorescence de la DHFR, il présente un maximum à ~ 340 nm (Figure 29) comme celui précédemment publié (156), qui témoigne de leur enfouissement et donc du repliement de notre protéine.

1.3 Spectres RMN de la DHFR

Des spectres RMN ^1H et ^1H - ^{15}N de la DHFR sous forme *apo*, en complexe binaire avec le folate ou ternaire avec le folate et le NADP^+ ont été enregistrés et comparés à ceux publiés dans la littérature (137).

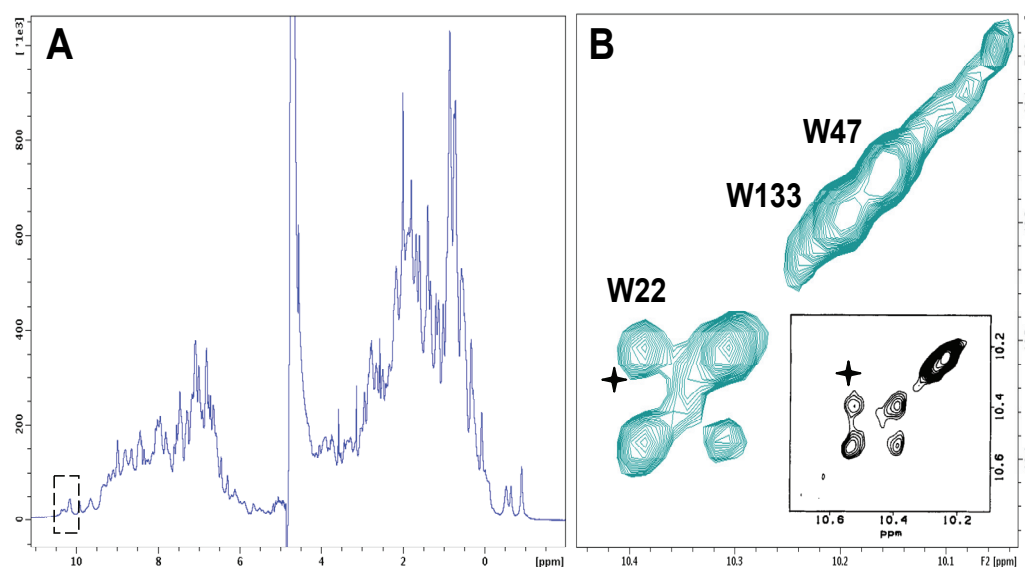
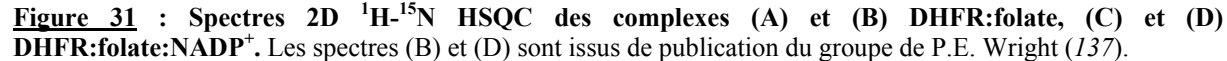


Figure 30 : (A) Spectre 1D ^1H de l'*apo*-DHFR (B) Région du spectre 2D ^1H NOESY ($t_m = 35$ ms) correspondant à la zone encadrée en (A) (149).

On observe sur la Figure 30, que la protéine est bien repliée avec un éclatement important des protons amides sur environ 4 ppm. Le blindage de quelques méthyles autour de 0 ppm est un autre indice du haut degré de structuration de l'enzyme. La Figure 30 présente également la zone de résonance des protons indoles des tryptophanes où l'on observe l'échange chimique du proton porté par l'azote du cycle indole du Trp22. Cet échange lent, de l'ordre de 35 s^{-1} , correspond au mouvement de la boucle M20 (ou Met20) qui est observable seulement pour la forme *apo* de la protéine et qui a précédemment été observé par Falzone et collaborateurs (149).



98

résidus lysine ou arginine qui sont repliés sur le spectre ou aux pics du folate ou du NADP⁺. La forte similarité entre les spectres RMN enregistrés et ceux déjà publiés est très satisfaisante, seules quelques rares indéterminations subsistent pour les pics de corrélations dont les déplacements chimiques sont très proches.

Les spectres de dichroïsme circulaire, de fluorescence et RMN sont fidèles à ceux publiés dans la littérature. Après avoir contrôlé les caractéristiques de notre protéine dans le tampon KP et attribué nos spectres RMN, nous avons donc débuté notre étude sur le comportement de la DHFR d'*E.coli* en présence d'osmolytes.

2. Impact des osmolytes sur l'activité de la DHFR

Nous avons commencé par mesurer l'activité de la DHFR pour des concentrations croissantes en TMAO, glycine bêtaïne, glycérol et tréhalose (Figure 32)

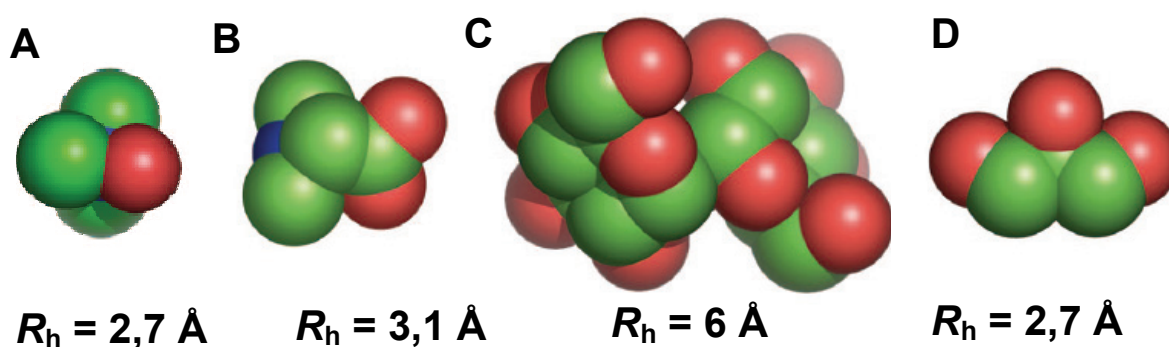


Figure 32 : Les différents osmolytes utilisés. (A) le TMAO, (B) la glycine bêtaïne, (C) le tréhalose et (D) le glycérol. Leurs rayons hydrodynamiques R_h respectifs sont indiqués.

Néanmoins, ces molécules sont des agents viscosogènes et l'obtention rapide d'un mélange homogène lors de l'ajout du cofacteur (NADPH) avant que la réaction ne soit trop avancée n'est pas facile. Par conséquent, nous avons obtenu dans un premier temps, des résultats peu reproductibles pour de fortes concentrations en osmolytes. Cependant, ce problème a pu être résolu en utilisant un appareil de stopped-flow pour faire nos mélanges réactionnels et suivre la cinétique d'absorbance à 340 nm comme présenté dans la partie « Matériel et méthodes ». Les résultats obtenus sont présentés Figure 33. On note que jusqu'à environ 0,25 M, les osmolytes ont peu d'effet sur l'activité de la DHFR puis nous observons que l'activité de la DHFR diminue avec l'ajout de TMAO, glycine bêtaïne, glycérol et tréhalose. Nous avons donc mis en évidence la « compatibilité » des osmolytes organiques (glycérol, glycine

bétaïne, tréhalose) puisque 0.25 M de KCl, un osmolyte inorganique, inhibe déjà 50% de l'activité catalytique de la DHFR (156).

Ensuite pour des concentrations identiques, le tréhalose inhibe plus la DHFR que la glycine, la bétaïne, le glycérol et le TMAO. À concentrations égales, le TMAO est l'osmolyte qui inhibe le moins la DHFR devant le glycérol. Néanmoins, il est possible que l'inhibition de la DHFR avec des concentrations croissantes en osmolytes puisse être en partie liée à l'augmentation de la viscosité du milieu. En effet, l'inhibition peut être causée par une diminution de la diffusion des ligands qui ont une probabilité moindre de se fixer sur le site actif de la DHFR.

Par conséquent, une manière de mettre en évidence l'inhibition liée aux propriétés intrinsèques des osmolytes, est de représenter l'inhibition de la DHFR en fonction de la viscosité croissante du milieu et de comparer les profils obtenus avec les différents osmolytes. Si l'inhibition de la DHFR est uniquement corrélée à l'augmentation de la viscosité, l'inhibition de la DHFR en fonction de la viscosité sera identique pour tous les osmolytes.

Nous avons donc tout d'abord déterminé les coefficients de diffusion translationnelle D de l'eau en fonction de la concentration en osmolytes. Ces coefficients de diffusion ont été mesurés à l'aide d'expériences RMN à gradient de champs pulsé (PGFSE-NMR pour *Pulsed Field Gradient Spin Echo*). On observe sur la Figure 33 que la diffusion des molécules d'eau est plus ralentie par le tréhalose, tandis que le TMAO, la GB et le glycérol ont des effets similaires sur la diffusion des molécules. Ces résultats sont en accord avec les valeurs de viscosités publiées pour des solutions contenant des concentrations variables de ces solutés (49, 205).

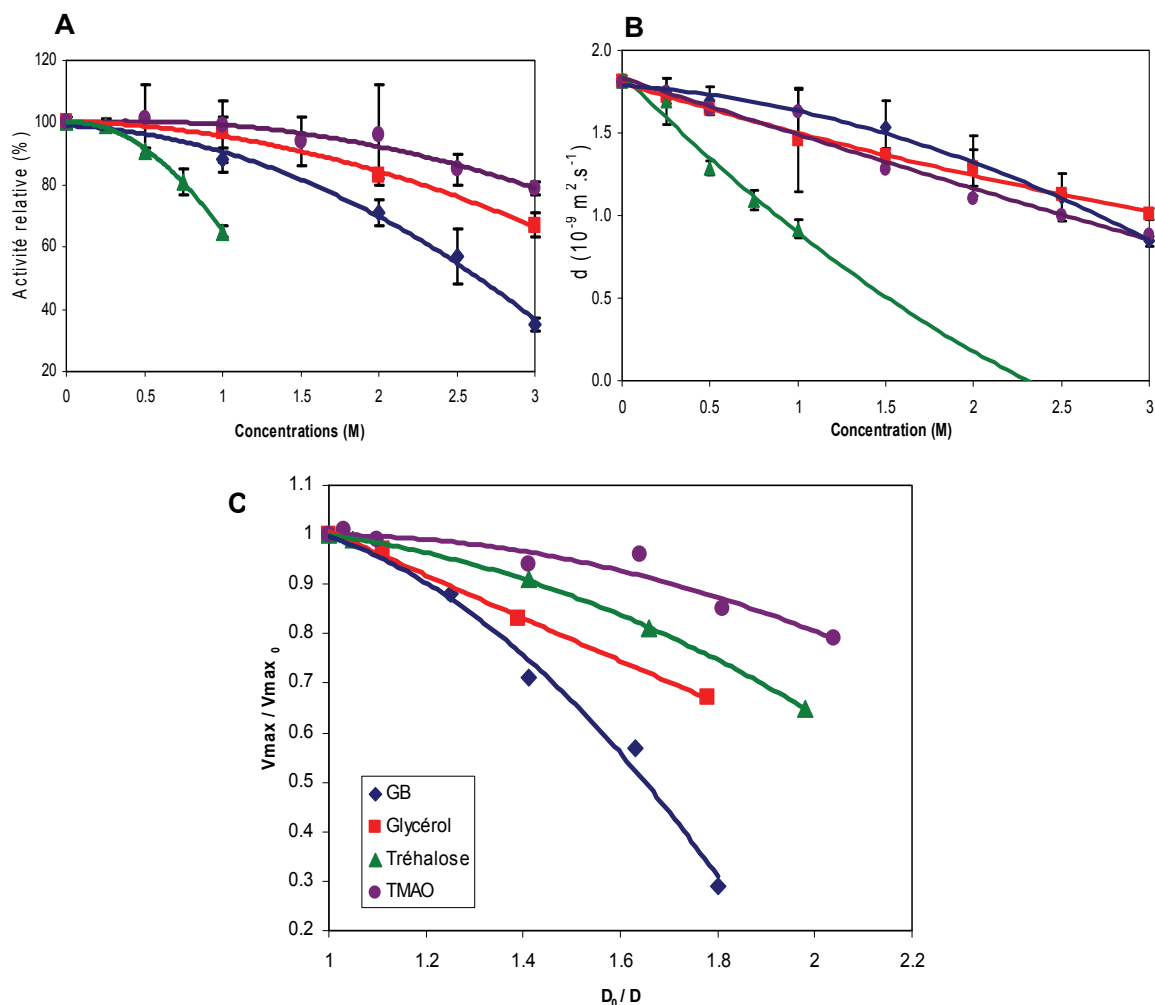


Figure 33 : (A) Activité de la DHFR et (B) coefficient de diffusion de l'eau en fonction de la concentration en osmolyte à 20°C. (C) Activité relative de la DHFR en fonction de la diffusion relative de l'eau à 20°C. D_0 et $V_{\max 0}$ sont respectivement la diffusion de l'eau et l'activité de la DHFR en absence d'osmolytes. η/η_0 est mesurée par la diffusion de l'eau (D_0/D). Une interpolation polynomiale a été utilisée.

Lorsque l'on trace les valeurs de V_{\max} relatives avec et sans osmolytes ($V_{\max}/V_{\max 0}$) en fonction des valeurs relatives des coefficients de diffusion de l'eau (D_0/D) correspondant à des concentrations variables en osmolytes, on observe que l'activité de la DHFR varie différemment avec la viscosité du milieu suivant la nature des osmolytes. On peut donc en conclure qu'un effet moléculaire intrinsèque, propre à chaque osmolyte et indépendant de leurs propriétés viscosogènes, a un impact sur l'activité de la DHFR. La glycine bêtaïne (GB) a un effet moléculaire inhibiteur plus important que le tréhalose, le glycérol et le TMAO. Si les polyols ont des effets comparables sur la DHFR, il est étonnant d'observer une telle différence pour les deux méthylamines (TMAO et GB).

Nous avons vu précédemment qu'*E.coli*, en cas de stress osmotique accumule majoritairement du KCl, de la GB et du tréhalose (42), au vu des résultats sur le KCl et de nos

résultats sur le GB, ce système d'osmolyte doit avoir un impact important sur la croissance d'*E. coli*. Néanmoins la quantité de GB accumulée *in vivo* est de maximum 0,7 M, à cette concentration, la DHFR conserve plus de 90% de son activité. Certaines études ont démontré que la GB était en agent centracarrant des sels, la croissance d'*E. coli* est plus rapide en présence de GB lors d'un stress osmotique (42).

3. Impact des osmolytes sur la structure globale, la stabilité et le repliement de la DHFR

3.1 La structure de la DHFR en présence d'osmolytes

Les spectres de dichroïsme circulaire et de fluorescence ont été enregistrés en absence et en présence de concentrations importantes en osmolytes : jusqu'à 3 M pour le glycérol, la glycine bêtaïne et le TMAO, 1 M pour le tréhalose et 1,5 M pour le KCl. Le spectre CD de la DHFR en présence de glycine bêtaïne n'a pas pu être enregistré car l'absorbance est trop importante sur la gamme de longueur d'onde d'étude. L'utilisation de KCl à forte concentration induit également une absorbance importante dans l'UV lointain à cause des ions Cl^- . Dans ce cas, il est néanmoins possible d'enregistrer des spectres de 200 à 240 nm, avec une cuve dont le chemin optique est de 0,2 mm au lieu de la cuve classique de 1 mm.

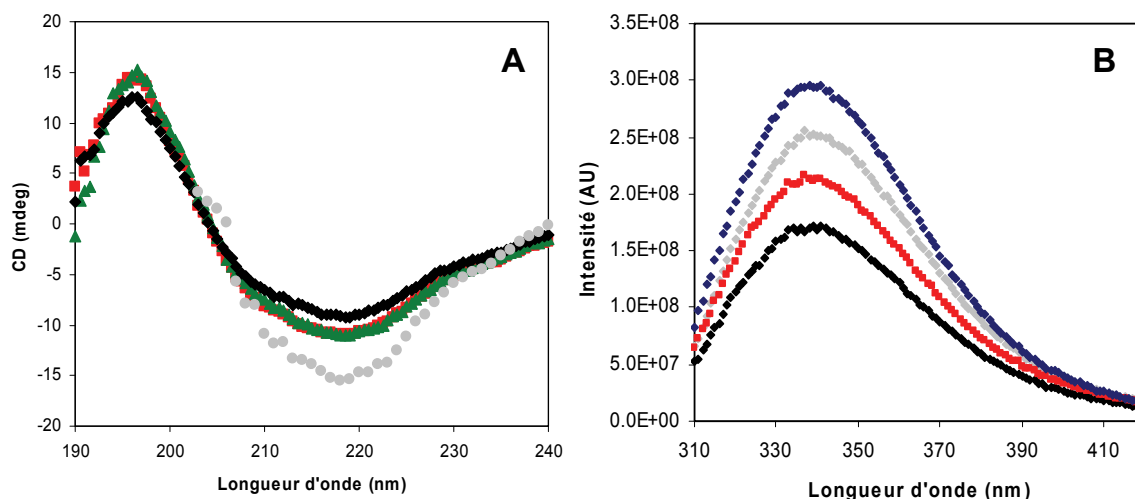


Figure 34 : (A) Spectres de dichroïsme circulaire et (B) d'émission de fluorescence de la DHFR à 20°C en présence d'osmolytes. Tampon KP (noir); glycérol 3 M (rouge); glycine bêtaïne 3 M (bleu); tréhalose 1 M (vert); KCl 1,5 M (gris)

On observe sur la Figure 34 que les spectres de dichroïsme circulaire sont très similaires, même avec de très fortes concentrations en osmolytes. Ils possèdent tous un maximum à ~196

nm et un minimum à ~219 nm. Les spectres de fluorescence de la DHFR en présence d'osmolytes présentent un maximum à ~340 nm comme le spectre de référence, cependant on remarque une augmentation importante de l'émission de fluorescence des cinq tryptophanes de la DHFR en présence d'osmolytes. De façon générale, les déplacements des maxima d'émission de fluorescence couplés à des variations du rendement quantique peuvent être interprétés par des variations de l'environnement local des tryptophanes. Dans notre cas nous observons uniquement une augmentation du rendement quantique qui est plus difficile à interpréter mais qui indique que l'environnement des tryptophanes ou la flexibilité de la protéine est néanmoins modifié en présence des osmolytes (Figure 34B).

Nous avons ensuite évalué l'impact des osmolytes sur la structure globale de la DHFR, à l'aide d'expériences ^{15}N -HSQC. Ces expériences permettent d'enregistrer une « empreinte » de la DHFR où les déplacements chimiques de chaque tâche de corrélation traduisent l'environnement chimique du N-H amide de chaque résidu. Nous avons enregistré des spectres 2D ^{15}N -HSQC de conformations *closed* et *occluded* pour divers osmolytes : la glycine bêtaïne, le TMAO, le tréhalose et le KCl (Figure 35). Le déplacement chimique de l'eau variant avec l'ajout d'osmolyte, nous avons donc utilisé une sonde interne, le triméthylsilyl-propionate (TSP) pour calibrer les spectres. La calibration des déplacements chimiques de l'azote est réalisée indirectement en pondérant l'écart de déplacement chimique proton au TSP (fixé à 0 ppm) par 0,101329, qui correspond au rapport des rapports gyromagnétiques.

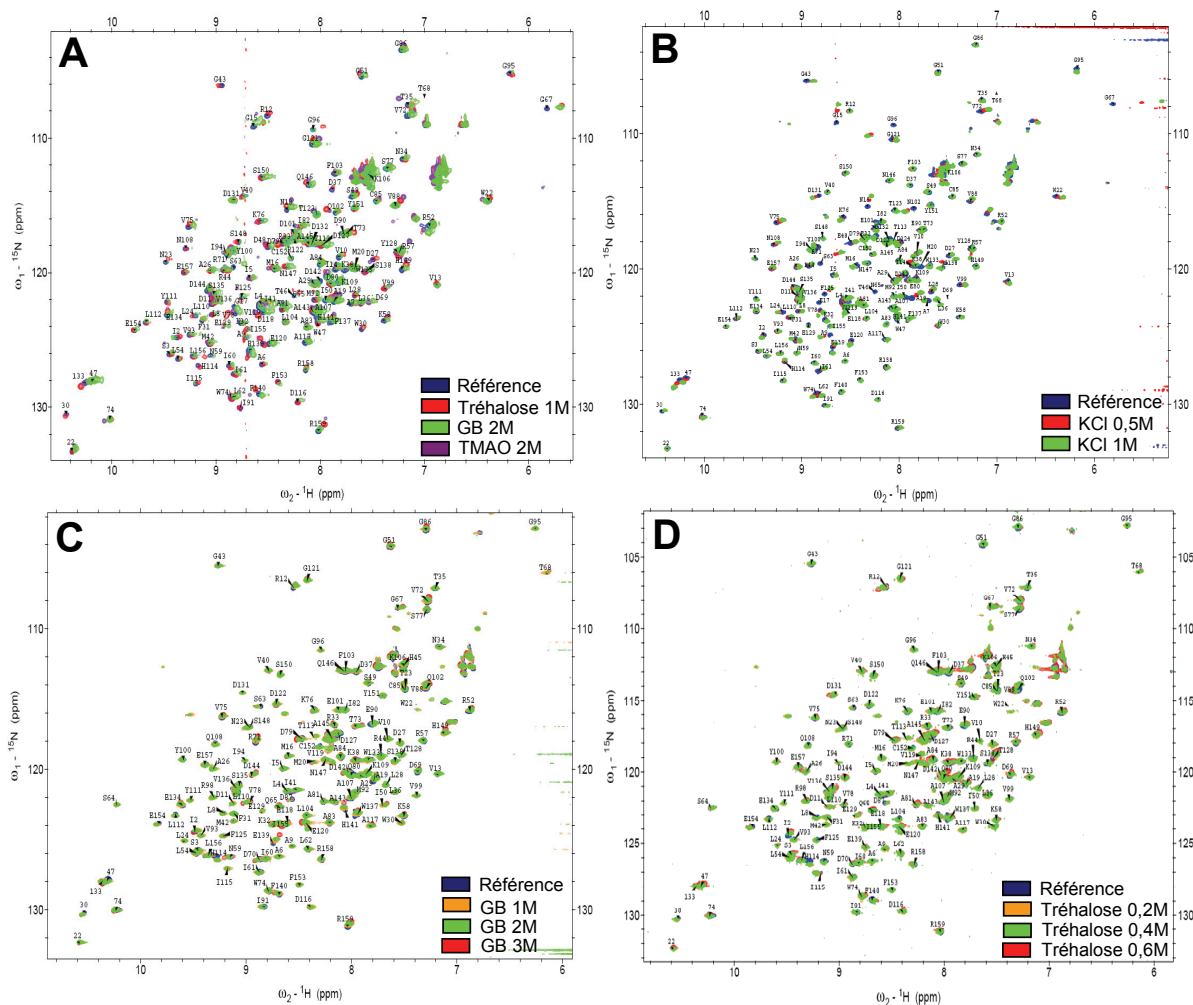


Figure 35 : (A) et (B) Spectres RMN 2D ^{15}N -HSQC du complexe *occluded* DHFR:folate et (C) et (D) du complexe *closed* DHF:folate:NADP $^{+}$ en présence d'osmolytes.

On observe que les spectres des deux conformations sont globalement peu affectés par la présence d'osmolytes. La plupart des variations de déplacements chimiques ne dépassent pas 0,05 ppm et la variation maximale atteint $\sim 0,11$ ppm en présence d'osmolytes organiques. En comparaison, on observe en présence de KCl quelques variations de déplacements chimiques dépassant les 0,2 ppm. Ces variations restent cependant relativement faibles au regard des variations de déplacements chimiques de la DHFR spécifiquement affectés par la fixation des ligands qui peuvent excéder 0,5 ppm pour les protons amide et 1 ppm pour l'azote. Une analyse fine de ces variations de déplacements chimiques sera présentée plus loin dans le manuscrit pour tenter de dégager des tendances.

La similarité des spectres RMN dans diverses conditions est en accord avec les résultats de dichroïsme circulaire et de fluorescence qui concluent sur l'absence de modifications

structurales majeures en présence d'osmolytes. De plus, nous avons démontré qu'aucune interaction forte spécifique n'était présente entre les osmolytes et la DHFR puisqu'aucun déplacement chimique n'est fortement affecté, même pour des concentrations importantes en soluté. En effet, il est proposé dans la littérature que les interactions osmolytes-protéines sont en général très faibles et seraient du même ordre que les interactions protéines-eau. Nous pouvons donc conclure que l'inhibition de l'activité de la DHFR en présence d'osmolytes, n'est pas liée à des modifications majeures de la conformation de la protéine, induite par les solutés, au cours de son cycle catalytique.

3.2 Effet des osmolytes sur la stabilité de la DHFR

Les osmolytes organiques, hormis l'urée, ont déjà été étudiés pour leurs propriétés stabilisantes des macromolécules. Il est ainsi possible de classer les osmolytes selon leur pouvoir stabilisant pour une protéine donnée (55). Nous avons effectué des expériences de dénaturation thermique de la DHFR en présence des osmolytes précédemment utilisés, sauf la glycine bêtaïne. La température de demi-dénaturation T_m de la DHFR a ainsi été déterminée dans différentes conditions.

Lors de ces expériences, nous avons tout d'abord remarqué que la DHFR, en absence ou en présence d'osmolytes, conserve des structures secondaires à 85°C, hormis en présence de KCl pour des concentrations supérieures à 1 M. Nous avons estimé que la DHFR conserve un taux de structure secondaire d'environ 63% en absence d'osmolytes, ce taux peut atteindre 72-73 % en présence de 1 M en tréhalose et 3 M en glycérol. En revanche, pour des concentrations de KCl supérieures ou égales à 1M, la protéine perd la totalité de sa structure secondaire à haute température. Il a en effet été préalablement démontré que la DHFR acquiert un état stable en globule fondu à haute température ou pour de fortes concentrations en urée (203).

Le fait qu'il subsiste une grande partie de structure secondaire à haute température explique que les courbes de transition thermique montrent une dispersion relativement importante des points expérimentaux, comme on peut le voir sur la Figure 36A. En effet, les écarts relatifs observés ne concernent qu'une partie des structures secondaires. Pour déterminer la transition thermique de la DHFR entre deux états, les fractions molaires de la structure native et la structure partiellement (ou totalement dépliée pour le KCl) sont respectivement ajustées à 0 et 1 dans les différentes conditions. On remarque que les températures de demi-dénaturation de la DHFR varient avec le milieu. Les largeurs de la transition sont semblables, hormis en

présence de tréhalose où le passage de la structure native de la DHFR à son état de globule fondu est plus graduel.

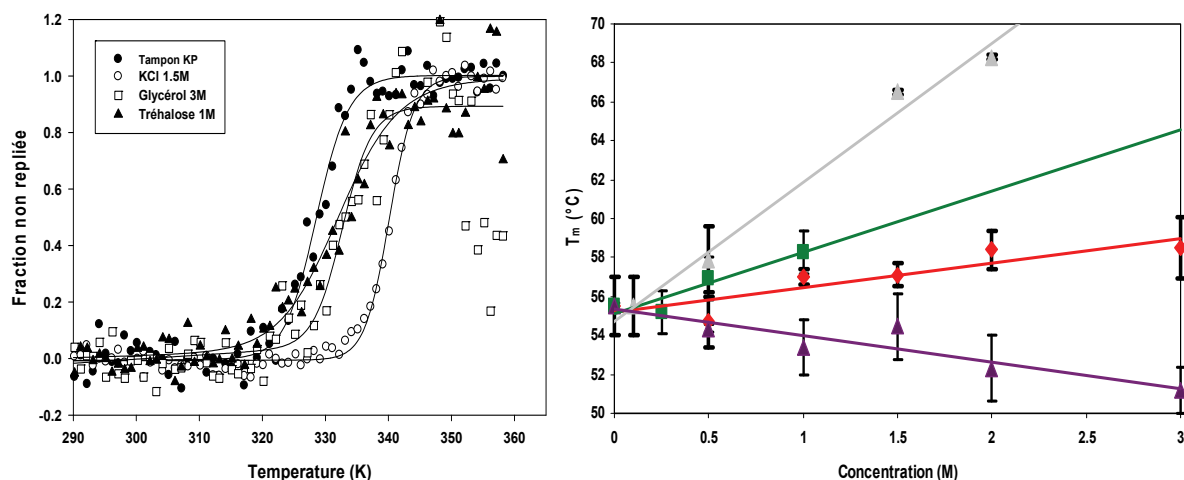


Figure 36 : (A) Transition thermique de la DHFR dans différentes conditions. (B) Température de fusion de la DHFR en fonction de la concentration en osmolytes. En rouge en présence de glycérol, en vert de tréhalose, en violet de TMAO et en gris de KCl.

Nous avons ensuite représenté la variation de la température de fusion T_m de la DHFR pour des concentrations croissantes en osmolytes sur la Figure 36B. La pente m , croissante ou décroissante, témoigne du pouvoir stabilisant ou déstabilisant chimique d'un osmolyte. On observe que la stabilité de la DHFR augmente linéairement avec la concentration des solutés pour tous les osmolytes étudiés sauf le TMAO. En effet, on constate avec surprise que le TMAO déstabilise sensiblement la structure de la DHFR avec une T_m qui diminue de 1,3 K par mole de TMAO. D'après des études sur d'autres protéines et les modèles théoriques, le TMAO est l'osmolyte organique qui, au contraire, possède classiquement, l'effet le plus stabilisant (55, 84).

Même si en présence de KCl la dénaturation est complète et irréversible, le KCl est l'osmolyte le plus stabilisateur avec une pente bien plus forte que celle du tréhalose et du glycérol. La T_m de la DHFR est augmentée de 7,1 K.M⁻¹ en présence de KCl, 3,1 K.M⁻¹ en présence de tréhalose et 1,3 K.M⁻¹ en présence de glycérol. On en déduit que le KCl est un agent stabilisant bien plus efficace que les deux polyols.

Si l'on considère que l'inhibition de la DHFR par les polyols est comparable, Il est intéressant de constater que les osmolytes qui stabilisent le plus la DHFR sont également ceux qui inhibent le plus son activité. Ainsi, on note que le KCl est très inhibiteur mais possède un effet stabilisateur important sur la DHFR et inversement le TMAO déstabilise légèrement la DHFR associé à une inhibition plutôt faible de la DHFR. Les polyols ont un pouvoir stabilisant

intermédiaire. Nous envisageons des expériences de dénaturation thermique, en présence de GB, en suivant la dénaturation de la DHFR sur une gamme de longueur d'onde de 250 à 350 nm (résidus aromatiques).

Ces résultats supportent l'hypothèse que la perte d'activité de la DHFR pourrait être liée à l'augmentation de sa stabilité. Il est, en effet, souvent proposé que la stabilisation des protéines est associée à une diminution de leur dynamique interne qui inhibe leur activité (206).

3.3 Étude du repliement de la DHFR après dénaturation thermique en présence d'osmolytes

Après dénaturation à 85°C et retour à 20°C, hormis en présence de KCl, les spectres présentent une allure un peu différente de ceux précédemment enregistrés (Figure 37). Ils sont décalés vers les faibles longueurs d'ondes avec un maximum à ~194 nm et un minimum à ~210 nm. En présence de 1,5 M de KCl, on observe que la DHFR ne se replie pas après dénaturation. En effet, à 0,5 M de KCl, le spectre de dichroïsme circulaire de l'enzyme, après dénaturation, est relativement différent du spectre après repliement en absence d'osmolytes et à partir de 1 M, la DHFR est incapable de se replier après dénaturation thermique. Il est probable que cette incapacité à se replier en présence de concentration importante en sel soit corrélée avec la perte totale des structures secondaires de la DHFR à 85°C dans ces conditions.

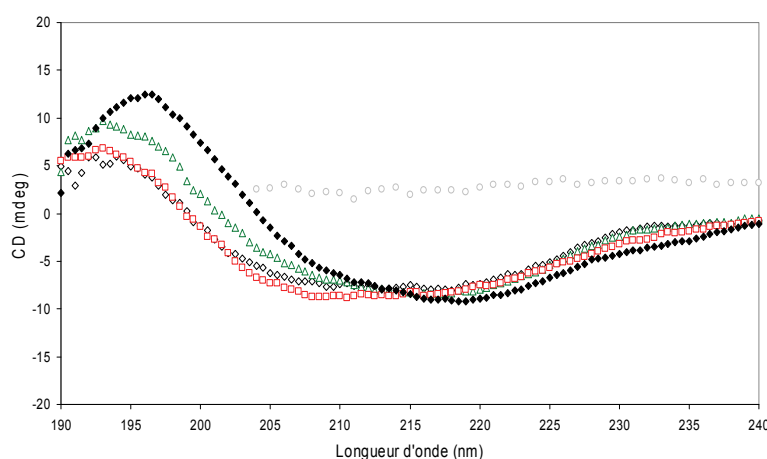


Figure 37 : Spectres CD de la DHFR à 20°C après dénaturation thermique. En blanc, dans le tampon KP, en rouge en présence de glycérol (3 M), en vert de tréhalose (1 M), en gris de KCl (1,5 M). Pour comparaison, le spectre de la DHFR en absence d'osmolyte avant dénaturation est en noir.

La déconvolution des spectres après dénaturation et repliement de la protéine laisse apparaître de façon reproductible une composition en structures secondaires un peu différente

de celle de la structure native. On remarque une faible diminution du pourcentage d'hélice α , tandis que le taux de brins β reste inchangé. Les résultats obtenus sont semblables à ceux observés en absence d'osmolytes. Ainsi, après repliement, 32 % des résidus de la protéine sont situés dans des brins β , 9 % dans les hélices et 23 % sont impliqués dans des coudes. La faible variation par rapport au spectre de la protéine native, la dénaturation thermique de l'enzyme est considérée comme réversible (203). Notons cependant que l'effet de la dénaturation thermique bien que faible, se retrouve aussi bien en absence d'osmolytes qu'en présence de glycérol et de tréhalose.

Au vu des résultats de dichroïsme circulaire, des concentrations importantes en osmolytes n'ont pas d'impact sur la composition en structure secondaire de la DHFR. La dénaturation thermique de la DHFR est considérée comme réversible en présence d'osmolytes organiques. Par contre, si la DHFR est capable de se replier suite à une dénaturation thermique en présence de 3 M de glycérol ou de GB, elle est incapable de se replier dans sa structure native dès 0,5 M de KCl. L'incapacité de la DHFR d'*E. coli* à se replier après dénaturation thermique, à partir de 1 M en KCl avait déjà été observée (156). Cette absence de repliement après dénaturation thermique, de la DHFR en présence de KCl, peut s'expliquer par l'écrantage des charges indispensables au repliement de l'enzyme, charges qui ne sont pas affectées par les osmolytes organiques neutres.

3.4 Effet des osmolytes sur la stabilité de la DHFR pour de longues durées à température ambiante

De nombreuses études, comme les mesures de l'activité catalytique ou encore l'enregistrement de spectres de dichroïsme circulaire ou d'émission de fluorescence, ne nécessitent pas des échantillons très concentrés en protéine et sont assez rapides à effectuer (quelques heures). Les expériences RMN nécessitent que des échantillons concentrés n'évoluent pas pendant des périodes de temps relativement longues, jusqu'à une semaine, à température ambiante. Si la dégradation protéique est facilement observable sur des spectres RMN avec l'apparition de nouvelles résonances sur les spectres, l'agrégation lente est plus difficile à observer. Nous avons donc laissé plusieurs échantillons de protéine à température ambiante en présence de divers solutés (glycérol 3M, glycine bêtaïne 3M, Tréhalose 1M) pendant un mois. Ces échantillons ont ensuite été déposés sur un gel d'acrylamide et sur une colonne d'exclusion pour contrôler la formation éventuelle de polymères. Sur le profil de sortie de la colonne d'exclusion, malgré l'ajout de concentrations importantes en osmolytes,

nous n'observons qu'un seul pic d'absorbance après 17 mL d'élution qui correspond à la DHFR. De même, il n'y a qu'une seule bande de migration sur le gel d'électrophorèse (Figure 38). Par conséquent, la DHFR ne polymérise pas et n'a pas tendance à s'agréger avec l'ajout d'osmolytes. La DHFR reste donc stable en présence de concentrations importantes en osmolytes, sur une période de temps compatible avec une étude par RMN.

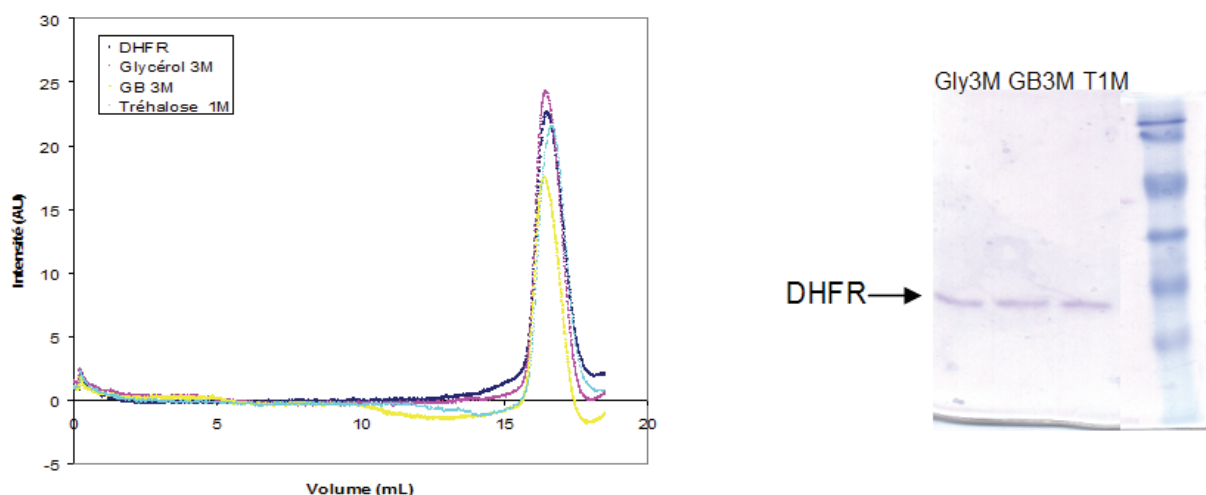


Figure 38 : Profil de sortie de colonne d'exclusion et de migration sur gel d'acrylamide de la DHFR en présence d'osmolytes (glycérol 3M, glycine bétaïne 3M et tréhalose 1M).

De plus, de nombreux spectres RMN 1D ^1H ont été enregistrés au début, pendant et à la fin des expériences RMN de longue durée comme les mesures de cinétique ou les expériences de dynamique. Nous n'avons quasiment pas observé d'évolution des spectres, en accord avec le fait que la DHFR reste stable et ne s'agrége pas sur une période de temps assez longue en absence ou en présence d'osmolytes.

4. Étude des interactions osmolytes-ligands ou osmolytes-DHFR

Les osmolytes sont des composés de notre système d'étude au même titre que l'eau, la DHFR et ses ligands. Nous avons vu précédemment que toutes ces molécules interagissent entre elles avec des affinités très variables. Nous avons donc vérifié si les interactions entre les osmolytes et la DHFR ou, les osmolytes et les substrats et cofacteurs de la DHFR, étaient suffisamment fortes pour être détectables par des expériences RMN. Nous avons tout d'abord étudié l'influence de l'ajout de soluté sur la diffusion de ligands de la DHFR, puis étudié les

interactions osmolytes-DHFR *via* des expériences de *chemical shift mapping* ou des mesures de temps de relaxation longitudinal T_1 des protons des osmolytes en présence de DHFR.

4.1 Influence des osmolytes sur la diffusion des ligands

Nous avons mesuré les coefficients de diffusion translationnelle du folate, DHF, NADP^+ et du NADPH en présence de concentrations croissantes en tréhalose, glycérol et glycine bétaïne. Les résultats des expériences RMN-PFGSE (décrites dans la partie « Matériels et Méthodes ») sont représentés sur la Figure 39.

On observe que les coefficients de diffusion des ligands diminuent avec des concentrations croissantes en osmolytes. La viscosité du milieu augmente en présence de soluté et ralentit les mouvements de translation des molécules. Les variations des coefficients de diffusion du folate, du DHF, du NADP^+ et du NADPH sont identiques pour des concentrations croissantes d'un osmolyte donné. On en déduit que chaque soluté a le même effet sur tous les ligands étudiés, ce qui exclut les interactions spécifiques osmolytes-ligands. Le fait que les osmolytes organiques soient pour la plupart non chargés limite les interactions osmolytes-ligands qui sont particulièrement délétères pour les activités des enzymes.

Par exemple, l'accumulation d'arginine, qui porte une charge positive à pH physiologique, diminue les constantes de Michaelis K_m de nombreuses enzymes impliquées dans la glycolyse en se fixant sur les ligands phosphorylés comme le phosphoénol pyruvate (PEP) ou le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) (207, 208). De même, les sels augmentent la constante de Michaelis de la pyruvate kinase de par la formation d'un complexe entre l'ion K^+ et le PEP qui devient incapable de se fixer sur l'enzyme.

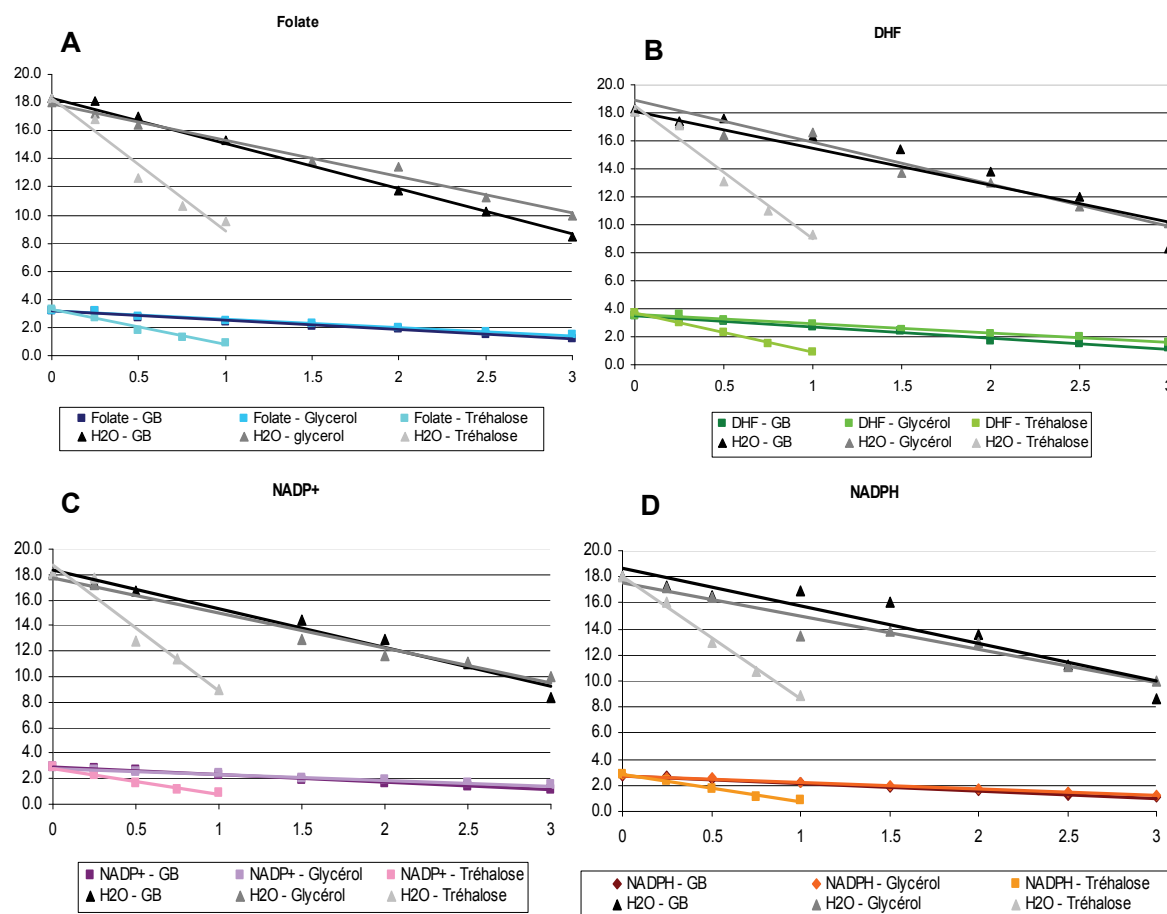


Figure 39 : Variations des coefficients de diffusion du (A) folate, (B) DHF, (C) NADP⁺ (D) NADPH pour différentes concentrations en osmolytes. En abscisses, la concentration en osmolyte (M) et en ordonnée le coefficient de diffusion D ($10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

Néanmoins, la diminution de la diffusion des substrats et des cofacteurs diminue la fréquence de rencontre avec la DHFR, et donc a probablement un impact sur son activité. L'amplitude de la réduction de la mobilité des ligands reste cependant la même pour le glycérol, la GB et le TMAO et ne peut donc pas expliquer les effets inhibiteurs différents de ces osmolytes à viscosité constante.

4.2 Analyse des déplacements chimiques et des intensités des pics de corrélation des protons amide de la DHFR

Lors de l'ajout des osmolytes, on observe un déplacement global des pics lié à la variation du déplacement chimique de l'eau ($\sim 0,02 \text{ ppm} \cdot \text{M}^{-1}$ d'osmolytes). On remarque également un effondrement général de l'intensité des signaux dû à l'augmentation du temps de corrélation de la protéine, elle-même liée à l'augmentation de la viscosité du milieu.

Cependant, après calibration des spectres à l'aide d'une référence interne, on remarque qu'il subsiste des variations de déplacements chimiques et d'intensités de certains pics de

corrélation. Ces variations témoignent d'une modification d'environnement local de certaines régions de la protéine. Ainsi, par exemple, sur la Figure 40 (ci-dessous), on observe en présence de concentrations croissantes en GB, des variations notables de déplacements chimiques de Glu118 et Glu139, et des variations moins importantes pour Asp70 et Glu120. De plus, certains pics ont une intensité qui diminue de façon bien différente de la tendance globale observée.

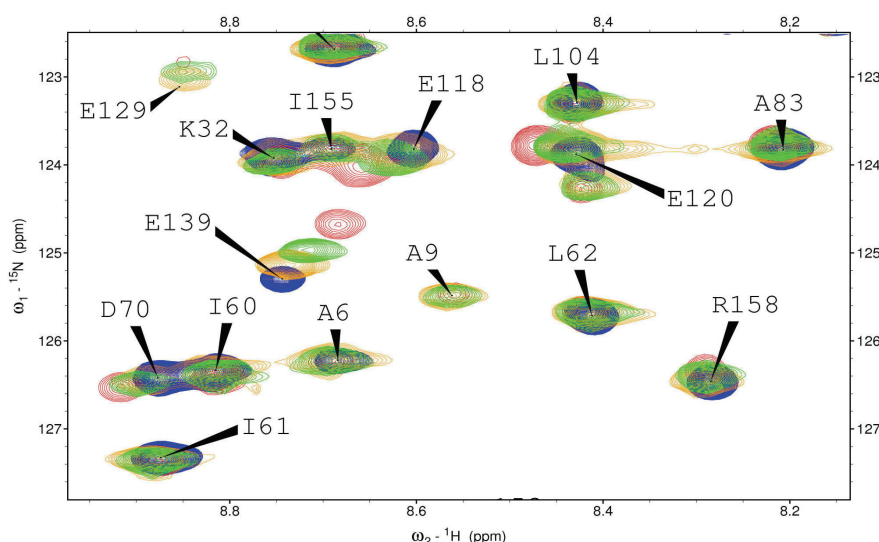


Figure 40 : Variations de déplacements chimiques de la DHFR dans une région du spectre 2D ^{15}N -HSQC, pour des concentrations croissantes en GB. En bleu : en absence de GB; en jaune : 1 M GB; en vert : 2 M GB et en rouge : 3 M GB.

Nous avons comparé ces variations de déplacements chimiques en présence d'osmolytes organiques (tréhalose et GB) avec celles observées pour des concentrations croissantes en KCl. Ceci nous permet d'apprécier les différences d'effets sur les déplacements chimiques d'un osmolyte chargé qui inhibe fortement la DHFR par rapport à des osmolytes organiques neutres qui comparativement ont un impact plus limité sur l'activité. Les variations de déplacement chimique de la DHFR induites par ces osmolytes sont présentées sur la Figure 41.

Les résidus les plus affectés par l'ajout d'osmolytes sont des résidus polaires mais pas forcément chargés. Quelques résidus hydrophobes subissent également des modifications de déplacements chimiques notables avec certains osmolytes comme les résidus Ile50, Val78 ou Val88. Ainsi, il semble que les perturbations de déplacements chimiques ne soient pas particulièrement liées à la nature des résidus mais plutôt à leur localisation dans la structure 3D de la DHFR. En effet, on remarque, sur la Figure 41, que les résidus dont les modifications de déplacements chimiques sont les plus importantes sont situés dans les

boucles. Des variations significatives sont notamment mesurables pour les résidus localisés dans les boucles entourant le site actif (M20, F-G et G-H) et celle qui permet la fixation du NADPH (ABL, *Adenosine Binding Loop*). On note également des modifications de déplacement chimique plus prononcées pour les deux résidus qui forment une charnière entre les deux domaines de la DHFR : Lys38 et Val88.

Les boucles sont composées principalement de résidus polaires et sont exposées au solvant par opposition au cœur hydrophobe des protéines. Il est donc cohérent de trouver les perturbations de déplacements chimiques les plus importantes dans ces régions de la DHFR. Cependant, ce ne sont pas tous les résidus en surface de la protéine, ni tous les résidus dans les boucles qui sont perturbés, une certaine spécificité ($\delta_{\text{tot}} > 0,05$ ppm) est observable pour les acides aminés suivants: Asp11, Arg12, Met20, Thr46, Ile59, Asp70-Thr73, Val78, Asp79, Ile115, Val119, Asp120, Tyr128, Asp139-His141, His149 en présence de GB et de tréhalose.

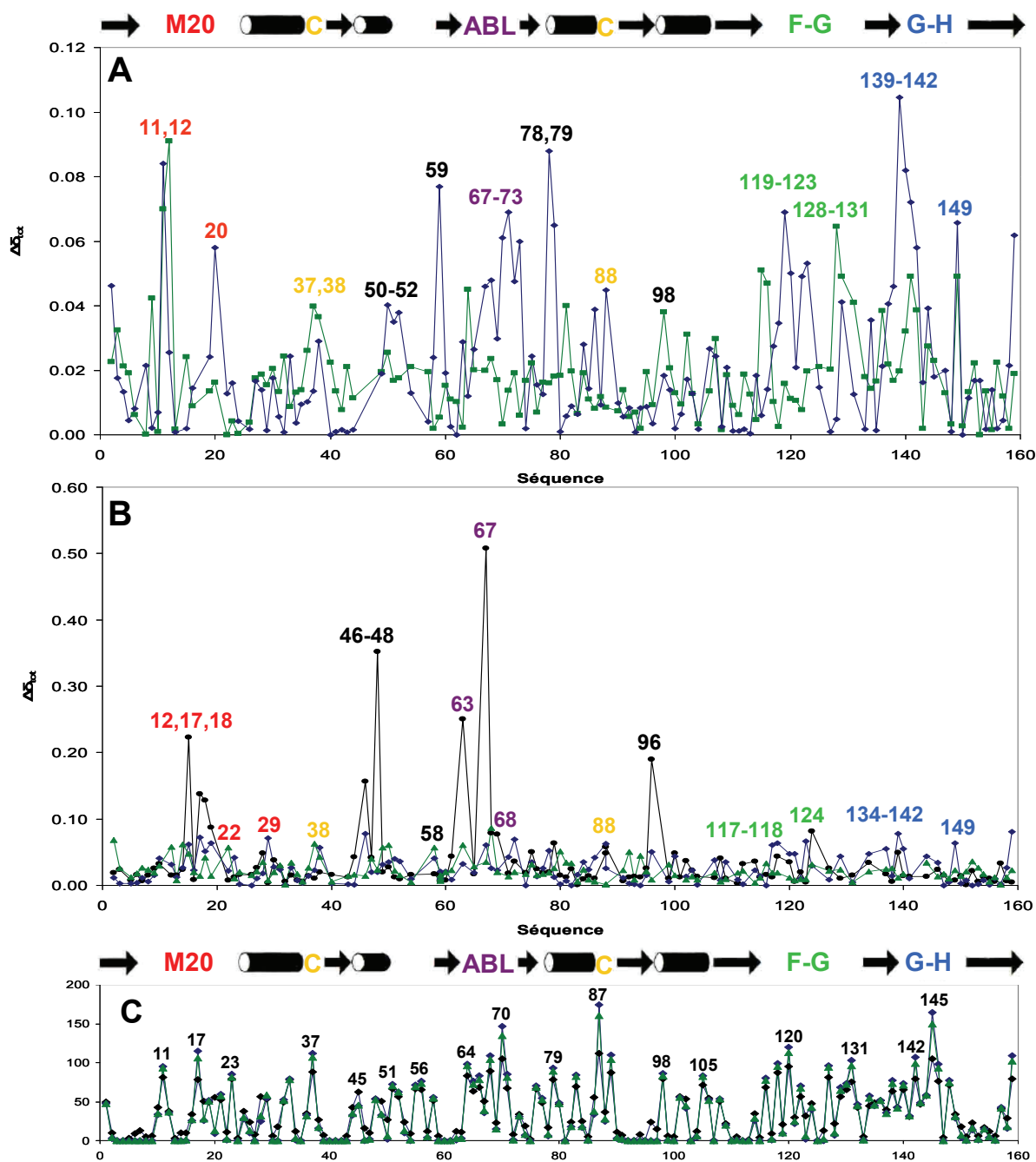


Figure 41 : Les variations de déplacements chimiques totaux des protons amides du complexe (A) *closed* et (B) *occluded* en fonction de la composition en osmolytes. En noir, KCl 1 M; en bleu, GB 2 M; en vert le tréhalose 0,8 M. (C) Accessibilité relative au solvant des résidus le long de la séquence de la DHFR calculé avec le logiciel NACCESS.

En présence de KCl, les variations de déplacements chimiques sont aussi présentées sur la Figure 41 (B) pour le complexe binaire DHFR:folate. On remarque tout d'abord que le KCl peut induire des variations de déplacements chimiques bien plus importantes (jusqu'à 0,5 ppm) que les osmolytes organiques mais également plus spécifiques. Ainsi les variations de

déplacements chimiques sont les plus importantes pour les protons amide des résidus suivants : Gly15, Asp17, Asn18, Thr46, Asp48, Ser63, Gly67 et Gly96.

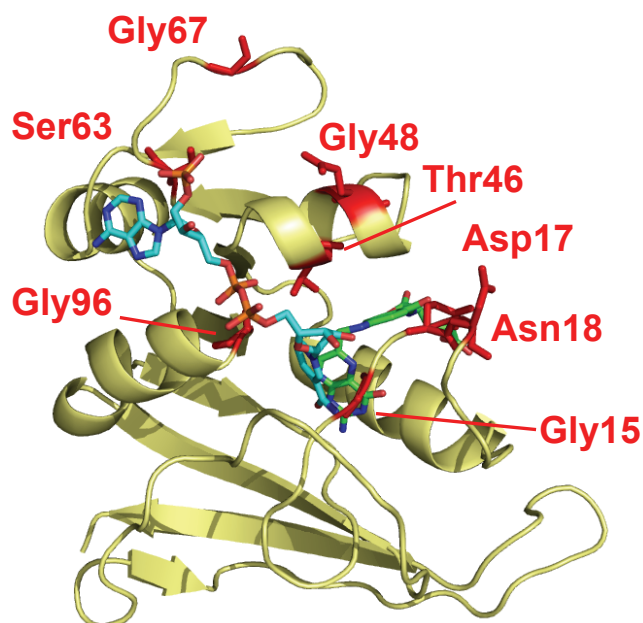


Figure 42 : Structures du complexe E:folate (PDB : 1RX7). Le NADP⁺ a été ajouté sur son site de fixation. Les résidus dont les variations de déplacements chimiques en présence de KCl sont les plus importantes sont indiqués en rouge.

Les acides aminés Gly15, Asp17 et Asn18 sont dans la boucle M20 et les Thr46 et Asp48 sont situés dans l'hélice H2 (à l'endroit où la boucle M20 vient fermer le site actif dans la conformation *closed*). Les résidus Ser63 et Gly67 sont dans l'ABL, la boucle qui bloque le NADPH sur son site de fixation et la Gly96 jouxte le site actif. Les acides aminés dont les déplacements chimiques sont très affectés ne sont pas essentiellement des résidus chargés, et trois résidus sur huit sont des glycines. Les glycines sont des résidus ayant une liberté conformationnelle importante qui apporte une certaine flexibilité au squelette protéique. Cependant, le point commun à tous ces résidus est qu'ils sont situés dans le site de fixation du NADPH comme on peut le voir sur la Figure 42. Cette observation est particulièrement intéressante, car le KCl et plus précisément les ions K⁺ (156, 202), inhibent fortement la DHFR, ceci peut être dû à une liaison spécifique de ces cations dans la poche de fixation du NADPH perturbant son activité.

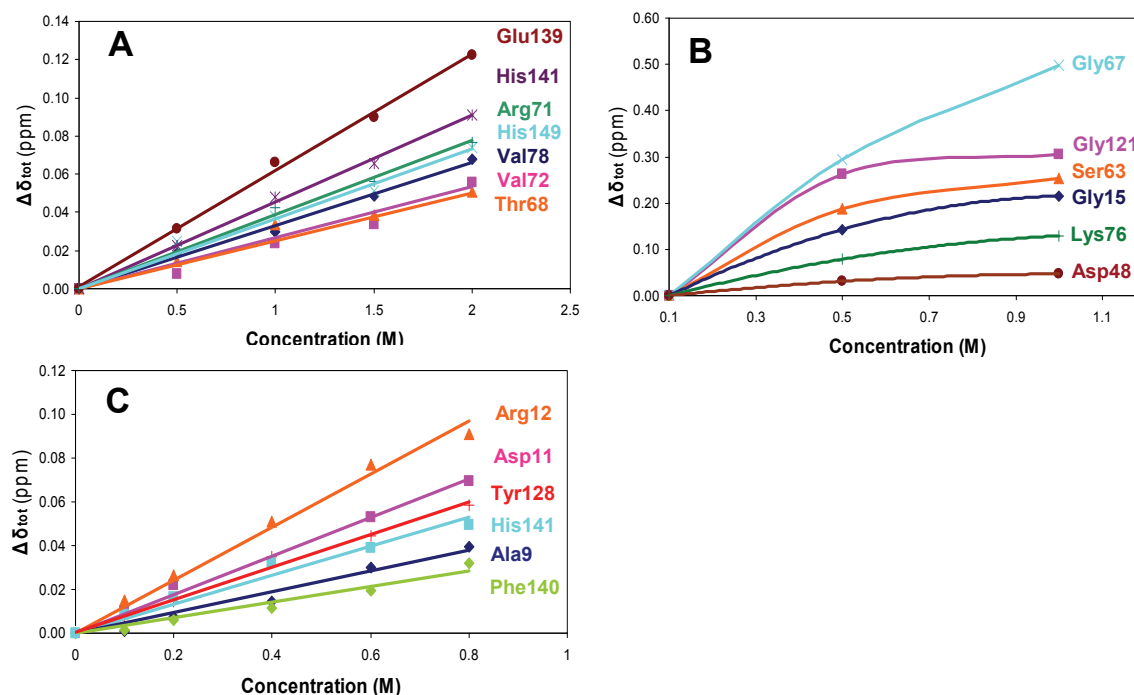


Figure 43 : Variations des déplacements chimiques de résidus de la DHFR (conformation closed) en fonction de la concentration en osmolytes. A) tréhalose, B) KCl et C) GB.

Nous avons ensuite tracé des courbes de titrage exprimant les variations de déplacements chimiques de la DHFR en fonction des concentrations en osmolytes (Figure 43). Les déplacements chimiques ^1H et ^{15}N des protons amides des résidus de la DHFR varient linéairement avec la concentration en tréhalose ou en GB sans signe de saturation comme on peut le voir sur la Figure 43. À l'inverse, les variations en présence de KCl sont différentes puisqu'un certain nombre de pics de corrélation se déplacent rapidement puis semblent se stabiliser, ce qui correspondrait à des signes de saturation. Cela suggère que l'interaction DHFR-osmolytes organiques et DHFR-KCl induisent des mécanismes différents.

Les variations de déplacements chimiques observées en présence d'osmolytes organiques sont très réduites et augmentent linéairement avec l'ajout de soluté. Ceci va dans le sens d'une interaction osmolytes-DHFR très faible et aspécifique. Ces résultats suggèrent que les osmolytes sont préférentiellement exclus de la surface de la DHFR. À l'inverse, l'interaction du KCl avec la DHFR semble plus forte, à la fois aspécifique pour la majorité des résidus et spécifique comme le montrent les amplitudes et l'évolution de certaines variations de déplacement chimique pour des concentrations croissantes en KCl. Il est en effet admis dans la littérature que les osmolytes organiques sont préférentiellement exclus de la surface des protéines et qu'au contraire les ions se lient fréquemment à la surface des protéines (208).

Ceci expliquerait pourquoi les ions inhibent de manière importante les enzymes tandis que l'effet des osmolytes organiques est bien plus faible. Si la différence entre les effets du KCl et des osmolytes organiques est assez flagrante, la comparaison entre le tréhalose et la GB est moins aisée de par les faibles variations observées. De manière globale, on remarque tout de même que les variations de déplacements chimiques de la DHFR en présence de GB sont plus importantes que celles en présence de tréhalose. Cette observation va dans le sens de modifications d'environnement plus importantes en présence de GB et de l'effet inhibiteur de la GB supérieur à celui du tréhalose à viscosité constante.

4.3 Mesure des temps de relaxation longitudinale des osmolytes en présence de DHFR

Afin de vérifier l'absence d'interaction directe entre la DHFR et les osmolytes, nous avons mesuré les temps de relaxation longitudinale des résonances ^1H des osmolytes à l'aide d'expériences classiques d'inversion-récupération. Ces temps de relaxation ont été mesurés à 293K et 306,4K, en absence et en présence de DHFR avec un rapport DHFR:osmolytes de 1:10 (100 μM DHFR et 1 mM osmolytes). Une méthode similaire a été utilisée par Jolival et ses collaborateurs (209) pour caractériser la fixation spécifique de l'ion thiocyanate sur la protéine BPTI en suivant la relaxation ^{15}N du KSCN.

De par la faible concentration protéique et la largeur des résonances de la DHFR, nous avons négligé la contribution des protons de la DHFR lors des mesures de relaxation T_1 des osmolytes. Nous avons sélectionné pour les mesures de T_1 , les pics de corrélation avec des déplacements chimiques à 3,10 ppm pour le TMAO; 3,27 ppm pour la GB et 3,46 ppm pour le tréhalose, les résultats sont présentés Figure 44.

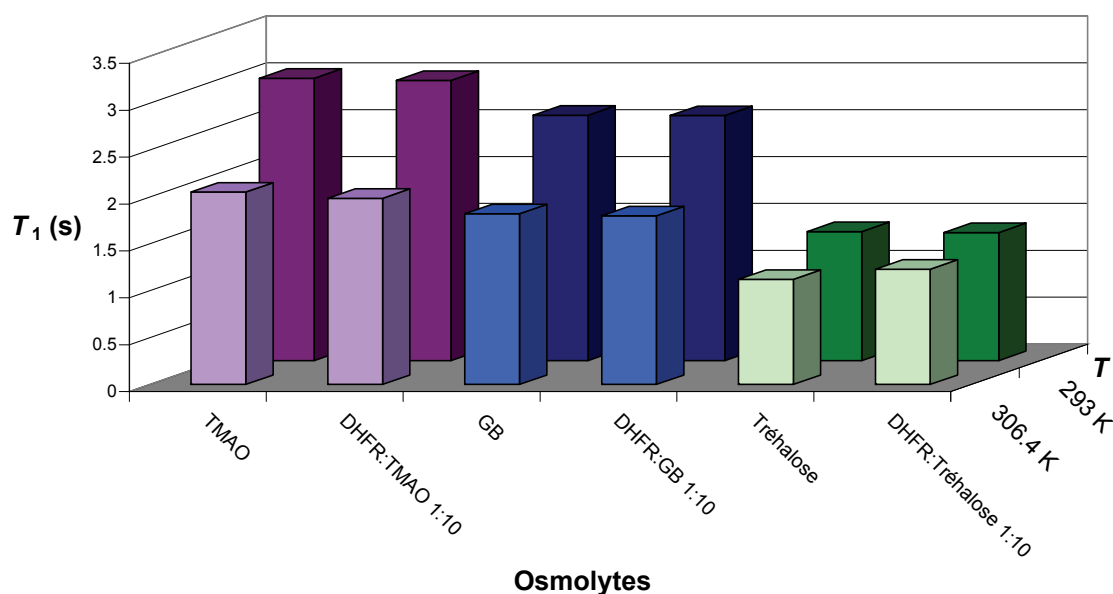


Figure 44 : Variations des temps de relaxations T_1 des osmolytes en absence et en présence de DHFR à 293K et 306,4K.

Le temps de relaxation T_1 est intimement lié aux temps de corrélation globale τ_c des molécules, il varie inversement à la température et à la taille des molécules. Ainsi on observe sur la Figure 44, que le T_1 du tréhalose est inférieur à celui de la GB qui est lui-même inférieur à celui du TMAO tandis que les rayons de ces molécules sont respectivement de 6 Å, 3,1 Å et 2,7 Å. De même, on vérifie que les temps de relaxation T_1 des molécules sont plus courts à 306,4 K qu'à 293 K. Tandis que les T_1 de ligands ou de substrats diminuent de manière importante avec l'ajout de protéines dans le milieu, l'ajout de DHFR n'a aucun effet mesurable sur les vitesses de relaxation longitudinale des osmolytes. Ce résultat confirme nos conclusions précédentes sur l'absence d'interactions fortes entre la DHFR et les osmolytes.

Après avoir étudié les interactions des osmolytes avec la DHFR et avec différents ligands, nous allons maintenant nous intéresser à la manière dont les osmolytes modulent l'interaction de la DHFR avec ses ligands en mesurant les constantes de dissociations k_{off} du folate et du NADP^+ en absence et en présence d'osmolytes.

5. Mesure du k_{off} du folate et du NADP^+ en présence d'osmolytes

5.1 Les déplacements chimiques du folate et du NADP^+ liés à la DHFR

Nous avons tout d'abord déterminé les déplacements chimiques des protons des ligands liés à la protéine dans la région du spectre des protons amides (Figure 45). Pour ceci, nous avons utilisé des expériences RMN de transfert de saturation par différence décrites dans la partie « Matériels et méthodes ». Cette technique avait précédemment été utilisée par plusieurs groupes pour étudier de nombreux complexes de la DHFR de *L. casei* et la DHFR d'*E. coli* (139, 182).

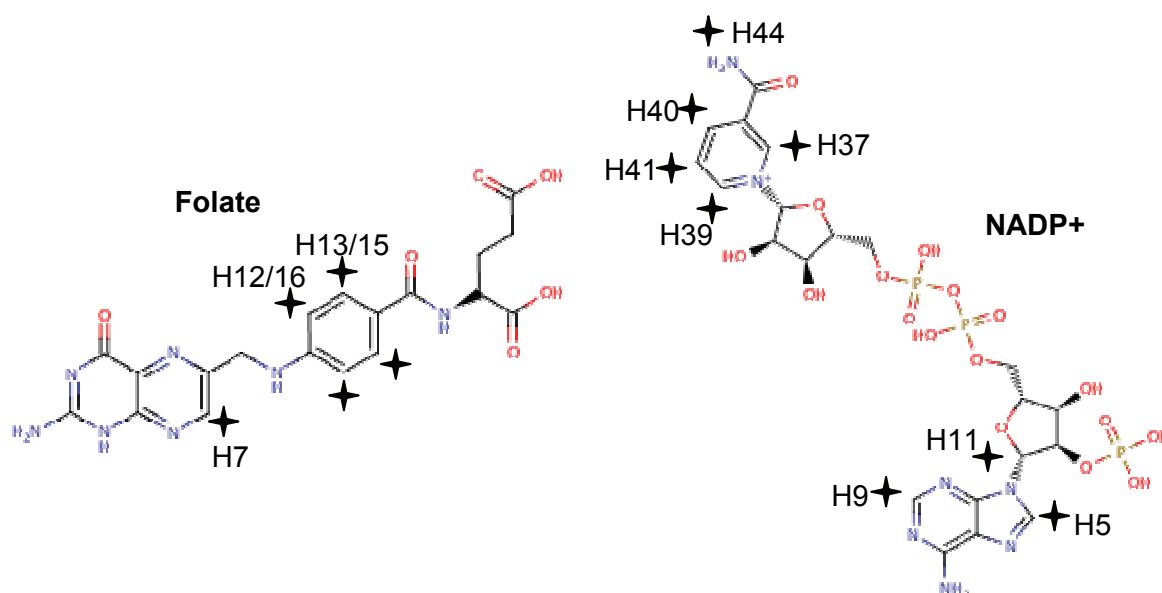


Figure 45 : Nomenclature des protons du folate et du NADP^+ .

Les déplacements chimiques du folate lié ont été déterminés à 293 K et 306,4 K pour le complexe binaire DHFR:folate. Les déplacements chimiques du folate et du NADP^+ dans le complexe DHFR:folate: NADP^+ n'ont pu être déterminés qu'à 306,4 K car la cinétique d'échange des ligands est trop lente à 293 K pour que l'on puisse observer les pics des ligands liés. Les irradiations des protons des ligands libres situés entre 6 et 7,5 ppm induisent des artefacts sur les spectres différences car les nombreux protons des chaînes latérales des résidus aromatiques de la DHFR qui se trouvent dans cette fourchette peuvent être également irradiés.

A

| Température | 293 K | | 306,4 K | |
|------------------|-------|------|---------|------|
| δH (ppm) | libre | lié | libre | lié |
| H7 | 8.23 | 9.33 | 8.53 | 9.60 |
| H12/H16 | 7.15 | 7.64 | 7.46 | 7.92 |
| H13/H15 | 6.20 | 5.36 | 6.55 | 5.65 |

B

| Folate | | | $NADP^+$ | | |
|------------------|-------|------|------------------|-------|-------|
| δH (ppm) | libre | lié | δH (ppm) | libre | lié |
| H7 | 8.53 | 9.64 | H37 | 9.13 | 10.06 |
| H12/H16 | 7.48 | 6.81 | H39 | 8.95 | 9.72 |
| H13/H15 | 6.57 | 5.45 | H40 | 8.66 | 8.94 |
| | | | H5 | 8.23 | 7.20 |
| | | | H41 | 8.02 | 9.34 |
| | | | H9 | 7.97 | 7.55 |
| | | | H11 | 5.98 | 6.83 |
| | | | H44 | 5.87 | 4.61 |

Table 4 : (A) Déplacements chimiques du folate dans le complexe DHFR:folate (B) Déplacements chimiques du folate et du $NADP^+$ dans le complexe DHFR:folate: $NADP^+$ à 306,4 K.

Néanmoins, nous avons réussi à déterminer les déplacements chimiques de tous les protons des ligands liés à la DHFR (Table 4). Les mêmes expériences ont été reproduites en présence d'osmolytes, cependant les déplacements chimiques de certains protons n'ont pu être déterminés de par le ralentissement de l'échange et l'élargissement des largeurs de raies avec l'augmentation de la viscosité. Les déplacements chimiques du folate et du $NADP^+$ liés à la DHFR varient très peu avec l'ajout d'osmolytes. Les osmolytes ne semblent donc pas avoir d'effet important sur le mode de fixation du folate et du $NADP^+$.

5.2 Impact des osmolytes sur la constante cinétique de dissociation k_{off} du folate et du $NADP^+$

La cinétique de dissociation du produit de réaction correspond à la vitesse limitante du cycle catalytique de cette enzyme. Aussi, après avoir constaté l'absence de modification structurale majeure induite par les osmolytes, des mesures permettant de corrélérer éventuellement la présence d'osmolytes avec la cinétique limitante paraissaient pertinentes. Les mesures de constante cinétique de dissociation du TMP en complexe avec les DHFR de *L.casei*, d'*E. coli* et des cellules de souris L1210 ont préalablement été déterminées par des expériences RMN de transfert de saturation (139, 183). De la même manière, les constantes cinétiques de dissociation du $NADP^+$ pour différents complexes de la DHFR binaire et ternaire d'*E. coli* ont été mesurées (182).

Lors de notre étude sur les complexes E:folate et E:folate:NADP^+ , nous avons choisi d'irradier sélectivement, pour des durées variables, le proton H7 du folate et le proton H37 du NADP^+ . Nos échantillons ont été préparés avec du D_2O et aucun proton des résidus aromatiques de la DHFR ne résonne à ces fréquences. Nous observons sur les spectres différences, lors de l'irradiation d'un pic du folate à l'état libre, l'émergence d'un seul pic de corrélation, correspondant au proton irradié, mais à l'état lié (Figure 46).

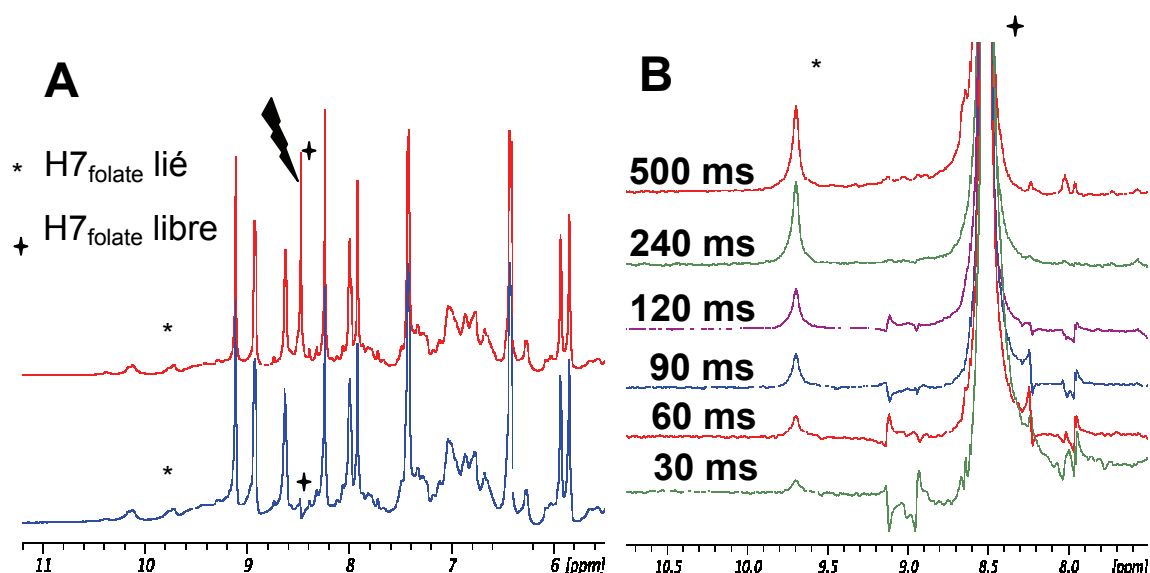


Figure 46 : (A) Spectres RMN 1D ^1H du complexe $\text{DHFR:folate:NADP}^+$ sans irradiation (rouge) et avec une irradiation sélective sur le proton H7 du folate (bleu) (B) Spectres différences des spectres (A) (le spectre bleu est soustrait au rouge) pour différentes durée d'irradiation.

On observe sur la Figure 46 (B) que plus la durée d'irradiation est longue, plus le transfert d'aimantation du proton H7 du folate libre vers le H7 du folate lié est important.

Les courbes ajustées à l'aide de l'équation [22] (Matériels et méthodes) sont présentées dans la Figure 47 ci-dessous en absence et en présence de concentrations croissantes en tréhalose. On observe bien l'augmentation de la différence d'aimantation $M_0 - M_t$ en fonction de la durée d'irradiation jusqu'à atteindre un plateau où le transfert de saturation est maximal et limité par la relaxation du proton lié et la cinétique de dissociation.

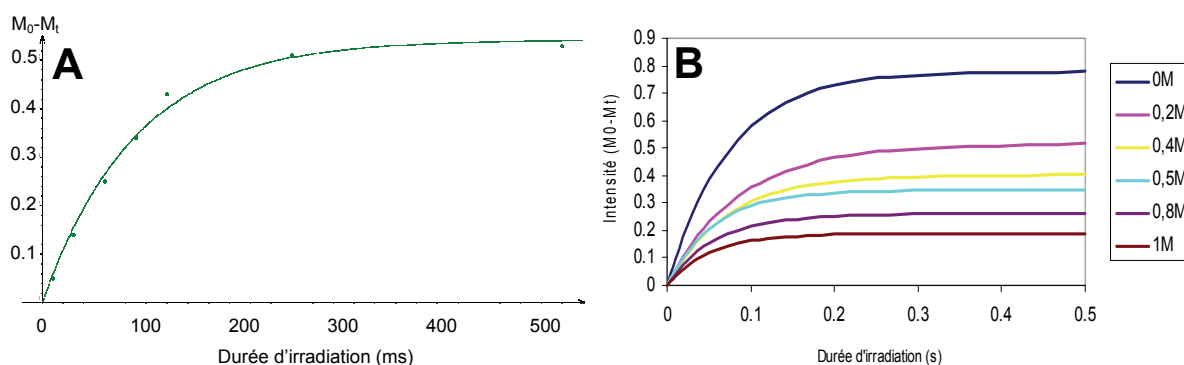


Figure 47 : (A) Variation de la différence d'intensité du pic de folate lié en fonction de la durée d'irradiation, (B) pour différentes concentrations en tréhalose. L'ajustement de régression non linéaire est effectué d'après l'équation [22] et permet de déterminer le T_1 apparent du proton du ligand lié, puis de calculer le k_{off} d'après l'équation [23].

Nous avons mesuré le k_{off} du folate en complexe avec la DHFR, sa valeur est de $8,8 \text{ s}^{-1}$ à 293 K dans du tampon KP 50 mM, KCl 100 mM. La mesure de k_{off} a précédemment été déterminée (35 s^{-1}) lors d'une étude de quenching de fluorescence mesuré par stopped-flow à 298 K dans un autre tampon contenant 100 mM NaCl (132). Lors d'expériences de transfert de saturation menées par un autre groupe sur d'autres complexes binaires, le k_{off} du TMP a été estimé à $6,8 \text{ s}^{-1}$ à 298 K (184) tandis que lors des études par stopped flow, il a été mesuré à 15 s^{-1} par le groupe de Benkovic (132). On remarque qu'il est difficile de comparer finement ces données de par les différentes conditions expérimentales et les différentes techniques utilisées. On note cependant que tous les k_{off} mesurés sont assez proches, bien que les valeurs des études cinétiques par stopped-flow semblent systématiquement supérieures à celles mesurées par RMN. Nous sommes donc satisfaits des valeurs de constante cinétique de dissociation que l'on obtient par transfert de saturation.

Par conséquent, nous avons ensuite mesuré les constantes cinétiques de dissociation du folate en complexe avec la DHFR en fonction de différentes concentrations en osmolytes à 293 K, les résultats sont présentés sur la Figure 48 ci-dessous.

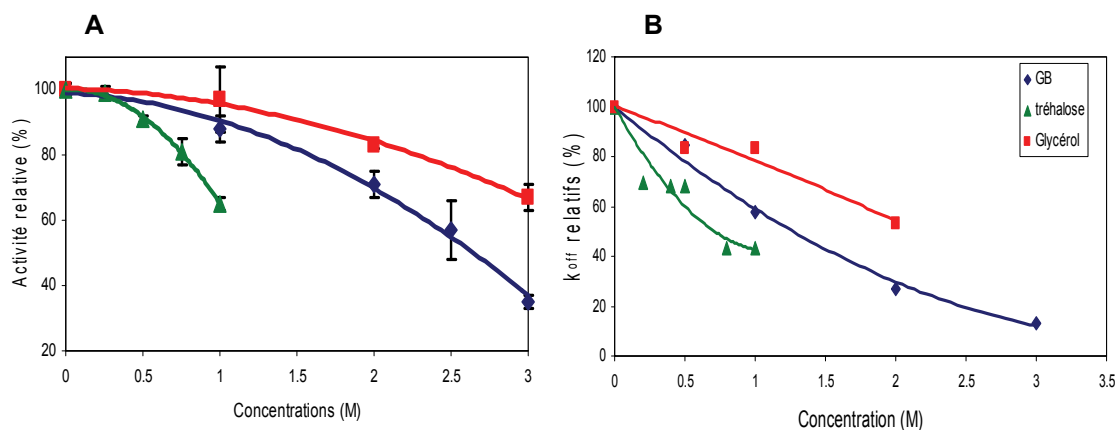


Figure 48 : Variation du k_{off} du folate dans le complexe binaire DHFR:folate, à 293 K, en fonction de la concentration en osmolytes. Une interpolation polynomiale a été utilisée pour le tracé des courbes.

On observe que les valeurs de k_{off} diminuent pour des concentrations croissantes en osmolytes avec un ralentissement décroissant en présence de tréhalose, de glycine bêtaïne puis de glycérol.

Nous avons ensuite mesuré les k_{off} du folate et du NADP^+ dans le complexe ternaire DHFR:folate: NADP^+ à 293 et 306,4 K, en absence et en présence de tréhalose 1 M (Table 5).

| | $k_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$ | | | |
|---------|----------------------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | Tampon KP | | Tréhalose 1M | |
| | Folate | NADP^+ | Folate | NADP^+ |
| 293 K | 1,4 | 2,8 | 1,1 | <i>nd</i> |
| 306,4 K | 3,7 | 11,5 | 1,4 | 1,7 |

Table 5 : Valeurs de k_{off} du folate et du NADP^+ dans le complexe DHFR:folate: NADP^+ . *nd* : non déterminée

On remarque que la valeur du k_{off} pour le folate dans le complexe ternaire ($1,4 \text{ s}^{-1}$) est bien plus faible que celle dans le complexe binaire ($8,8 \text{ s}^{-1}$). Comme les constantes cinétiques de dissociation sont relativement lentes pour les deux ligands à 293 K, il est difficile de les quantifier lors de l'ajout d'agents viscosogènes qui de plus, augmentent les largeurs de raie. Nous avons donc fait des mesures à 306,4 K afin d'augmenter la cinétique d'échange des ligands et d'avoir un transfert d'aimantation plus efficace entre le proton du ligand à l'état libre et celui à l'état lié. Une fois de plus, en présence de tréhalose, on observe une diminution des constantes cinétiques de dissociation des ligands.

On constate que les constantes cinétiques de dissociation des ligands de la DHFR diminuent avec les osmolytes testés. Les k_{off} des ligands dans le cycle catalytique de la

DHFR sont tous de l'ordre de la s^{-1} et l'étape limitante est la libération du produit comme on l'a vu dans la partie bibliographique. Il est donc probable que les osmolytes inhibent l'activité de la DHFR en ralentissant la vitesse de sortie des ligands. De même, la corrélation entre la cinétique de l'enzyme et la dynamique de la boucle M20, suggère que les osmolytes ont un impact sur la dynamique de la DHFR. Nous allons donc étudier la dynamique interne de la DHFR en présence d'osmolytes.

6. Dynamique de la DHFR en présence d'osmolytes

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, si de nombreuses études ont été menées pour comprendre la manière dont les osmolytes (dé)stabilisent les protéines, peu de travaux ont été réalisés pour caractériser leur impact sur la dynamique des protéines. Nous avons donc réalisé des expériences de relaxation ^{15}N afin d'obtenir des informations sur la dynamique, à l'échelle de la picoseconde à la nanoseconde, du complexe DHFR:folate:NADP⁺.

6.1 Analyse de la dynamique interne du complexe ternaire DHFR:folate:NADP⁺

La procédure pour extraire les paramètres de relaxation R_1 , R_2 et NOE a été décrite dans la partie « Matériels et méthodes ». La Figure 49 (A, B) présente pour exemple, des spectres enregistrés pour différents délais t_r afin de déterminer le temps de relaxation T_1 des résidus de la DHFR en complexe avec le folate et le NADP⁺. On peut observer en Figure 49 (D) l'ajustement de l'intensité des pics croisés en fonction de t_r selon une fonction exponentielle décroissante. La Figure 49 (C) présente également une superposition de spectres avec et sans irradiation lors d'une expérience NOE hétéronucléaire.

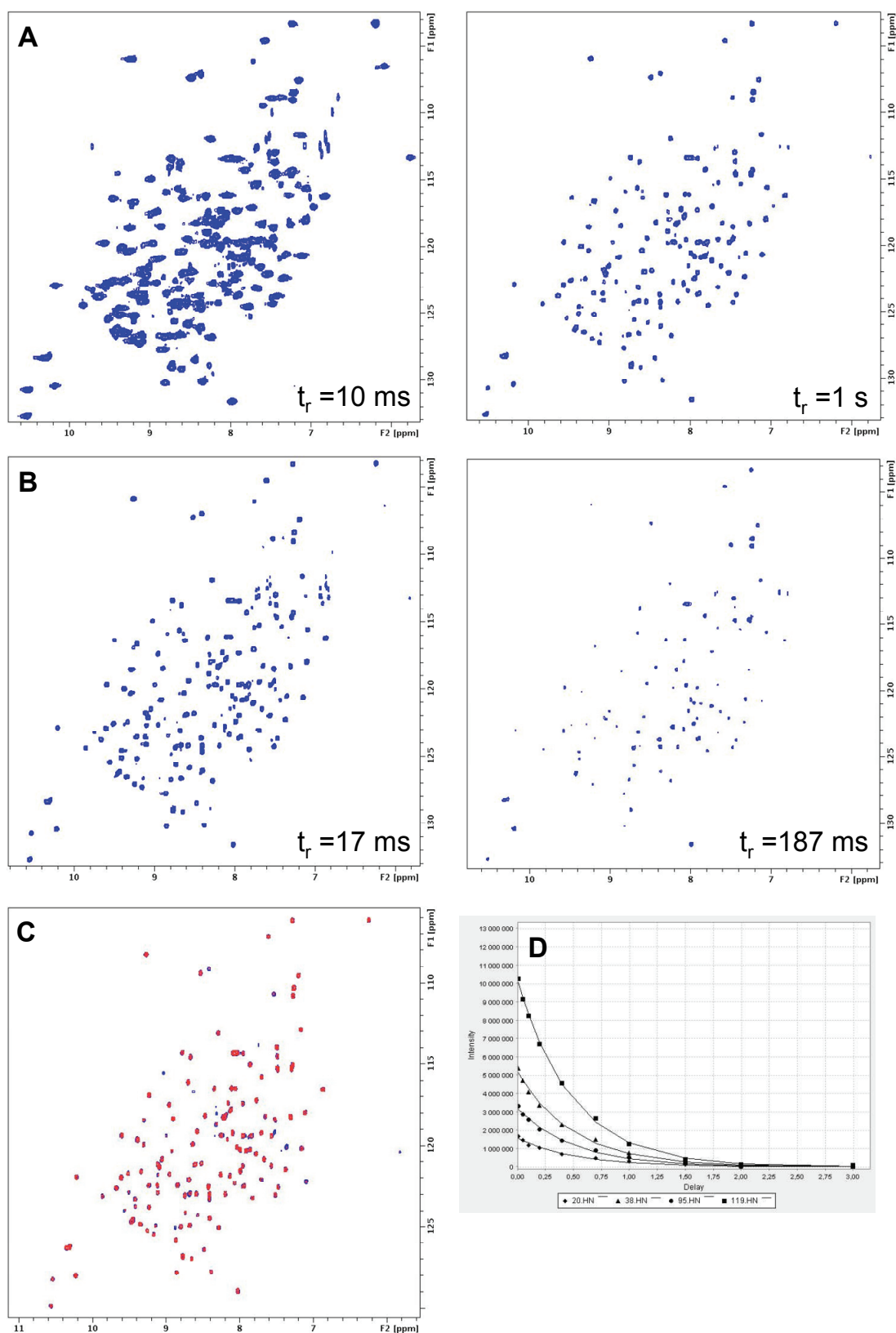


Figure 49 : Exemples de spectres 2D ^{15}N -HSQC (DHFR:folate:NADP $^+$) enregistrés avec différents délais t_r pour mesurer (A) R_1 et (B) R_2 . (C) Superposition de spectres sans (en bleu) et avec irradiation (en rouge) pour mesurer l'effet NOE hétéronucléaire. (D) Exemples d'ajustement de R_1 pour quatre résidus.

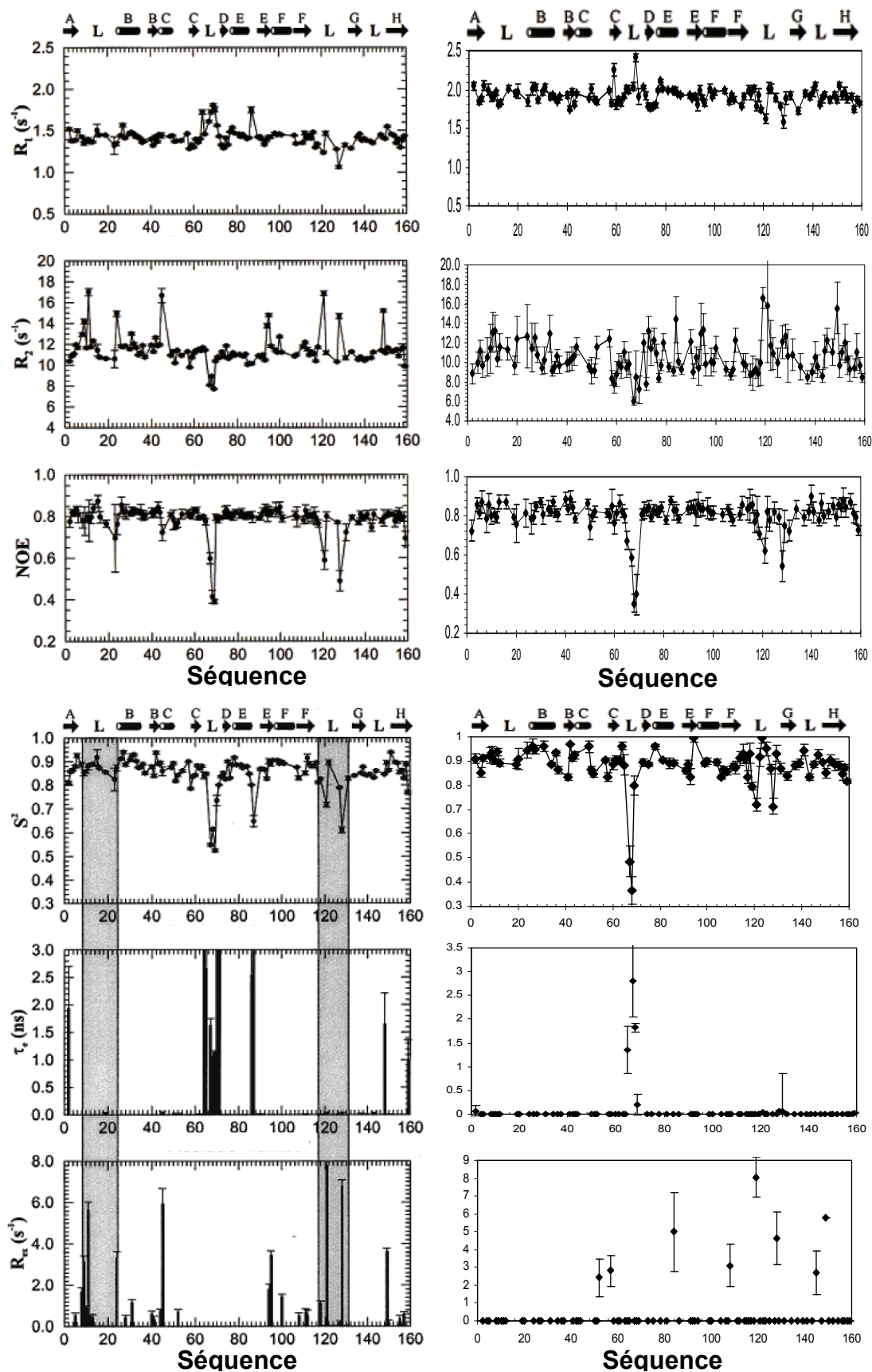


Figure 50 : Données et paramètres de relaxation de la DHFR (DHFR:folate:NADP⁺) mesurés par Osborne et coll à 600 MHz (à gauche) comparés à nos mesures (à droite) à 500 MHz dans les mêmes conditions d'études.

6.1.1 Description des données de relaxation en absence d'osmolytes

Je vais tout d'abord décrire les données de relaxation que nous avons obtenues, en absence d'osmolytes, dans les mêmes conditions que celle du groupe de P. Wright (137). Les valeurs exactes de R_1 , R_2 et NOE ne sont pas disponibles, cependant on peut se baser sur les profils de données de relaxation publiés par ce groupe. Ces mesures nous serviront de référence pour ensuite évaluer l'impact des osmolytes sur les données de relaxation et sur les mouvements moléculaires de la DHFR.

Lors des expériences de relaxation ^{15}N en absence d'osmolytes, nous avons pu mesurer les paramètres T_1 , T_2 et NOE pour 108 résidus. Tous les acides aminés, autres que les prolines et celui en position N-terminale donnent des pics de corrélation sur les spectres ^{15}N -HSQC. Cependant certains résidus, dans des régions flexibles donnent des pics peu intenses, de plus les données de relaxations ne peuvent être extraites de pics superposés. Osborne et coll. ont pu obtenir des données de relaxation de 112 résidus pour un champ B_0 de 600 MHz, nous avons donc un jeu de données presque aussi complet que celui précédemment publié. Quelques pics se sont déplacés sensiblement par rapport aux spectres publiés, induisant des superpositions, de même l'intensité de certains pics est devenue trop faible pour mesurer précisément les paramètres de relaxation dans notre cas. Les résultats sont présentés Figure 50, en comparaison avec ceux obtenus par Osborne et coll.

La valeur moyenne des vitesses de relaxation R_1 extraites est de $1,92 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$. Les valeurs de R_1 sont globalement uniformément réparties autour de cette valeur moyenne. Néanmoins, certains résidus présentent des valeurs de R_1 plus importantes comme les résidus 59 et 68 avec des valeurs supérieures à $2,2 \text{ s}^{-1}$. D'autres ont des valeurs sensiblement plus faibles comme les acides aminés 121 et 128. Les valeurs de R_1 que nous avons mesurées à 500 MHz sont supérieures aux vitesses publiées qui présentent des valeurs autour de $1,4$ à $1,5 \text{ s}^{-1}$ à 600 MHz. Cette différence s'explique par l'augmentation de la vitesse de relaxation R_1 avec la diminution du champ B_0 .

La valeur moyenne des vitesses de relaxation transversales R_2 est de $10,51 \pm 1,31 \text{ s}^{-1}$. La dispersion des valeurs de R_2 est beaucoup plus importante que celle des R_1 . Les valeurs de R_2 mesurées oscillent entre 9 et 12 s^{-1} . Comme pour les R_1 , on remarque que la relaxation transversale de certains acides aminés est bien plus élevée que la moyenne : résidus 10, 11, 33, 73, 74, 75, 84, 95, 119, 121, 149. La plupart de ces résidus peuvent être impliqués dans un phénomène d'échange chimique qui a pour effet d'augmenter leur vitesse de relaxation R_2 . Au

contraire, quatre résidus ont des valeurs de R_2 bien inférieures à la moyenne : 59, 67, 68 et 69. Nos valeurs de relaxation R_2 sont plus dispersées que celles que l'on trouve dans la littérature avec une incertitude plus importante sur les mesures. Néanmoins des tendances comparables sont observables.

Les résidus de la DHFR possèdent une valeur moyenne des NOE hétéronucléaires de $0,80 \pm 0,02$. Certains résidus possèdent des NOE inférieures à 0,65 (67, 68, 69, 121, 128) qui témoignent d'une dynamique importante. Nos valeurs de NOE sont similaires à celles déterminées par le groupe de P. Wright.

6.1.2 Temps de corrélation et analyse des données de relaxation par le modèle model-free.

Nous avons ensuite effectué une analyse model-free avec le logiciel Tensor2 qui permet d'interpréter nos données de relaxation en termes de mouvements. Le temps de corrélation global τ_c a été estimé à l'aide du logiciel Tensor2. Si on considère que le mouvement de la DHFR est isotrope $\tau_c \sim 7,72 \pm 0,05$ ns. Cette valeur est proche de celle publiée (8,42 ns). Néanmoins, il apparaît qu'une diffusion anisotrope avec un tenseur axialement symétrique décrit le mieux nos données expérimentales. Le degré d'anisotropie ($D_{\text{par}}/D_{\text{per}}$) est de 1,35 tandis que dans la littérature il est de 1,15-1,18. D'après nos mesures, l'anisotropie de notre système est donc légèrement plus importante. Le paramètre d'ordre S^2 , les mouvements internes τ_e et le terme d'échange R_{ex} sont présentés le long de la séquence sur la Figure 50. La valeur moyenne de S^2 est de $0,88 \pm 0,02$ similaire à celle d'Osborne et coll. qui est de 0,87. Si l'on compare le profil des S^2 des deux études, on note que les mêmes résidus ont des valeurs de S^2 faibles : 67, 68, 121, 128. Ces acides aminés ont une amplitude de mouvement plus importante que les autres résidus de la DHFR. Pour le résidu 87 qui a également une dynamique importante d'après la littérature, nous n'avons cependant pas pu obtenir de données de relaxation assez précises pour ce résidu car l'intensité de son pic NOE est trop faible sur nos spectres. Sept résidus possèdent des mouvements internes τ_e (jusqu'à environ 3 ns), ils sont principalement localisés dans l'*adenosine binding loop* (65-69). On note sur le profil publié, l'existence de mouvements internes pour les résidus 87 et 149. De même sur le profil R_{ex} , quelques résidus possédant un terme d'échange dans l'étude précédente en sont dépourvus dans nos données.

Nous avons mesuré des données de relaxation comparables à celles publiées précédemment, qui constituent une bonne base pour comparer l'effet des osmolytes sur la dynamique du complexe de Michaelis de la DHFR. Dans la partie suivante, nous avons analysé l'impact du tréhalose et de la GB sur la dynamique de ce complexe.

6.2 Analyse de la dynamique interne du complexe ternaire DHFR:folate: NADP⁺ en présence d'osmolyte

Nous avons reproduit ces expériences avec des concentrations croissantes en tréhalose (0,2 M, 0,5 M et 0,8 M) et en GB (1 M, 2 M et 3 M). Néanmoins, comme on l'a vu précédemment, les osmolytes sont des agents viscosogènes dont l'effet ralentit significativement le *tumbling* des protéines (210). Le résultat est une perte de la qualité des données dont je souhaite discuter dans une première partie avant de présenter nos résultats.

6.2.1 Effet de la viscosité sur la mesure et l'analyse des données de relaxation

Avec l'ajout des osmolytes, les raies des résonances des protons de la DHFR sont élargies. Par conséquent, le rapport signal sur bruit décroît, ce qui diminue fortement la précision des mesures des paramètres de relaxation. De plus, cet élargissement induit des superpositions des pics de corrélations et certains pics, peu intenses dans des conditions standards, ne sont plus visibles. Les données de relaxation extraites sont donc moins complètes et surtout moins précises en présence d'osmolytes.

On observe en effet sur les profils des données de relaxation (Figure 51) et dans le Tableau 6 que les incertitudes sur les mesures augmentent avec l'ajout des osmolytes. Les résultats des expériences à 0,8 M en tréhalose et 3 M en GB, de par la faible qualité des mesures sont difficilement interprétables et ne sont pas présentés. Les données de relaxation et les paramètres d'ordre sont présentés dans la Figure 51 et les valeurs moyennes sont répertoriées dans le Tableau 6. Ces erreurs ont un impact direct sur l'interprétation des données et seul le paramètre d'ordre est présenté car il constitue un indicateur fiable, indépendant de la procédure statistique de modélisation de la fonction densité spectrale (189).

En effet, lors de l'ajustement des données pour modéliser la fonction densité spectrale, l'augmentation importante de l'erreur sur les mesures va favoriser l'ajustement des données de relaxation selon le modèle 1. Ceci va aboutir à une disparition artificielle des paramètres τ_e et R_{ex} pour décrire le mouvement des résidus. De plus, la diminution du rapport signal sur

bruit due à l'augmentation du temps de corrélation, induit une perte d'information qui cible plus spécifiquement les résidus possédant un terme d'échange. Ces résidus ayant les R_2 les plus élevés seront les premiers à disparaître du spectre lors de l'ajout de concentrations importantes en osmolytes.

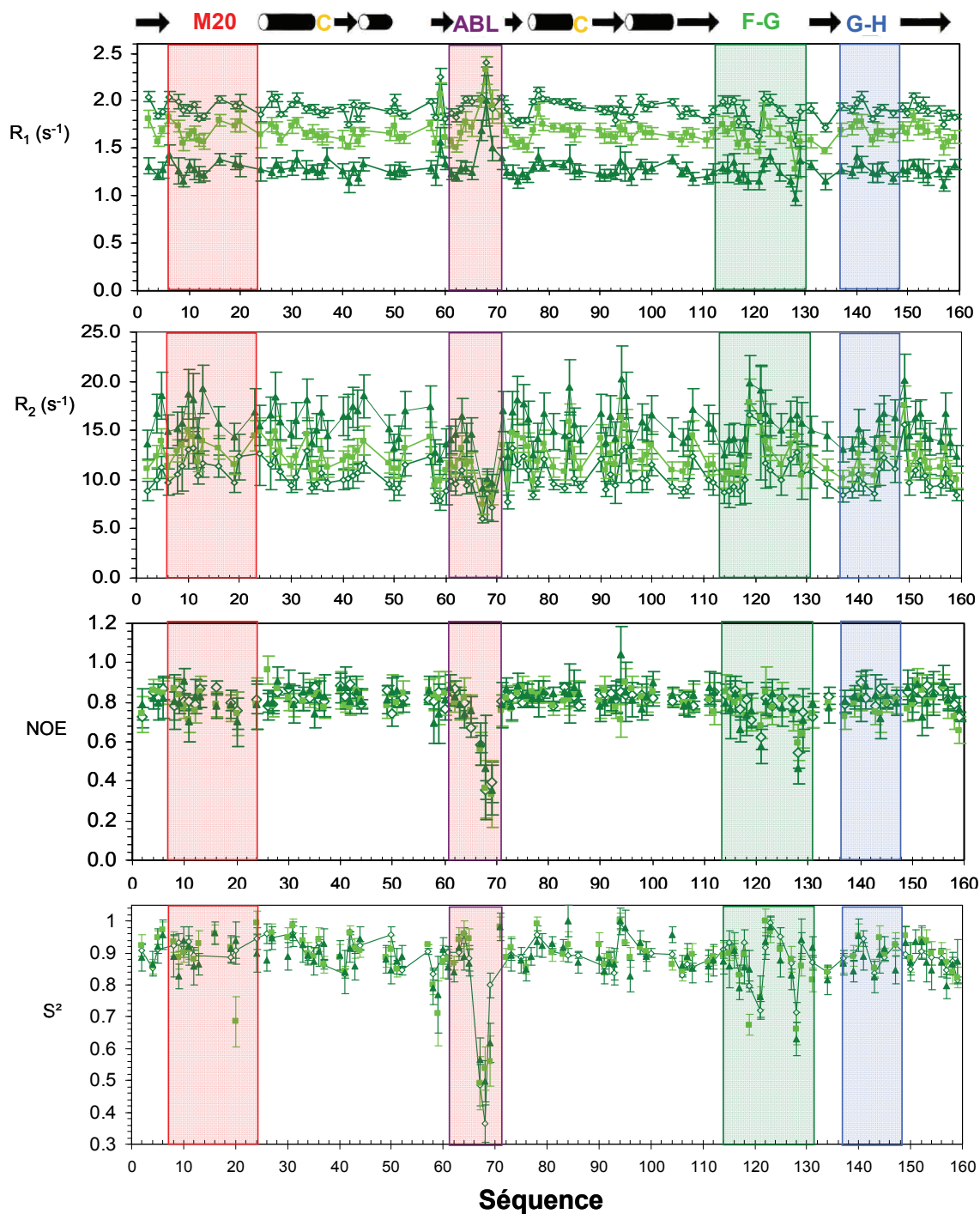
Ceci explique en partie pourquoi après analyse, il subsiste seulement un ou deux résidus présentant de l'échange chimique en présence de 0,5 M de tréhalose et 2 M de glycine bétaïne. On observe le même phénomène lors de l'étude de CspB en présence de 70 % d'éthylène glycol (EG) où seulement 6 résidus conservent un terme d'échange contre 55 en absence d'EG. Il est peu probable que tous ces résidus n'aient plus de mouvement de l'ordre de la micro-milliseconde et c'est vraisemblablement la mauvaise qualité des données de relaxation R_2 pour 70% d'EG qui est responsable de ce résultat (211). Il apparaît donc plus prudent d'analyser nos valeurs de relaxation R_1 , R_2 et NOE ainsi que le paramètre S^2 , et de mesurer expérimentalement le terme d'échange R_{ex} via des expériences de relaxation.

6.2.2 Mesure et analyse des données de relaxation en présence d'osmolytes

En présence de tréhalose et de GB, on note tout d'abord une diminution globale des vitesses de relaxation R_1 et une augmentation des vitesses de relaxation R_2 . Les valeurs de relaxation croisée restent centrées autour de 0,8. Les variations de R_1 et R_2 , proportionnelles à la concentration en osmolytes, s'expliquent par l'augmentation graduelle de la viscosité du milieu et sont indépendantes de la nature des osmolytes. Cette évolution des données de relaxation a précédemment été observée sur la protéine CspB de *Bacillus subtilis* (211) en présence d'éthylène glycol et la barnase de *Bacillus amyloliquefaciens* en présence de glycérol (212). Ces variations de vitesse de relaxation R_1 et R_2 sont liées à la baisse du temps de corrélation global de la DHFR avec l'augmentation de la viscosité du milieu. Les valeurs moyennes du paramètre d'ordre sont indépendantes de la viscosité du milieu et similaires dans toutes les conditions. On en conclut que les osmolytes étudiés n'ont aucun impact sur la flexibilité globale du squelette de la DHFR. Le groupe de Loria a démontré que lorsque la ribonucléase A est déstabilisée en présence d'urée, son squelette est beaucoup plus flexible (80). L'ajout de TMAO permet alors de réduire l'amplitude de ces fluctuations et de retrouver un paramètre d'ordre proche de celui des conditions standards. Nous avons démontré que les ajouts de tréhalose et de GB (et de TMAO, en cours d'étude) ne permettent pas de rigidifier davantage le squelette de la DHFR à l'état natif.

| | Tampon KP | Tréhalose 0.2M | Tréhalose 0.5M | GB 1M | GB 2M |
|--------------------------|-------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| R_1 (s ⁻¹) | 1.92 ± 0.04 | 1.67 ± 0.07 | 1.29 ± 0.08 | 1.62 ± 0.07 | 1.33 ± 0.09 |
| R_2 (s ⁻¹) | 10.51 ± 1.3 | 12.34 ± 1.18 | 15.43 ± 1.75 | 12.51 ± 1.41 | 14.98 ± 2.36 |
| NOE | 0.80 ± 0.02 | 0.78 ± 0.03 | 0.80 ± 0.04 | 0.81 ± 0.04 | 0.79 ± 0.05 |
| τ_c (ns) | 7.72 ± 0.05 | 9.53 ± 0.07 | 12.69 ± 0.1 | 9.78 ± 0.06 | 12.36 ± 0.14 |
| S^2 | 0.88 ± 0.02 | 0.88 ± 0.03 | 0.88 ± 0.05 | 0.89 ± 0.03 | 0.88 ± 0.05 |

Tableau 6 : Paramètres de relaxation, temps de corrélation global τ_c et paramètres d'ordre S^2 moyens des résidus de la DHFR dans le complexe de Michaelis.



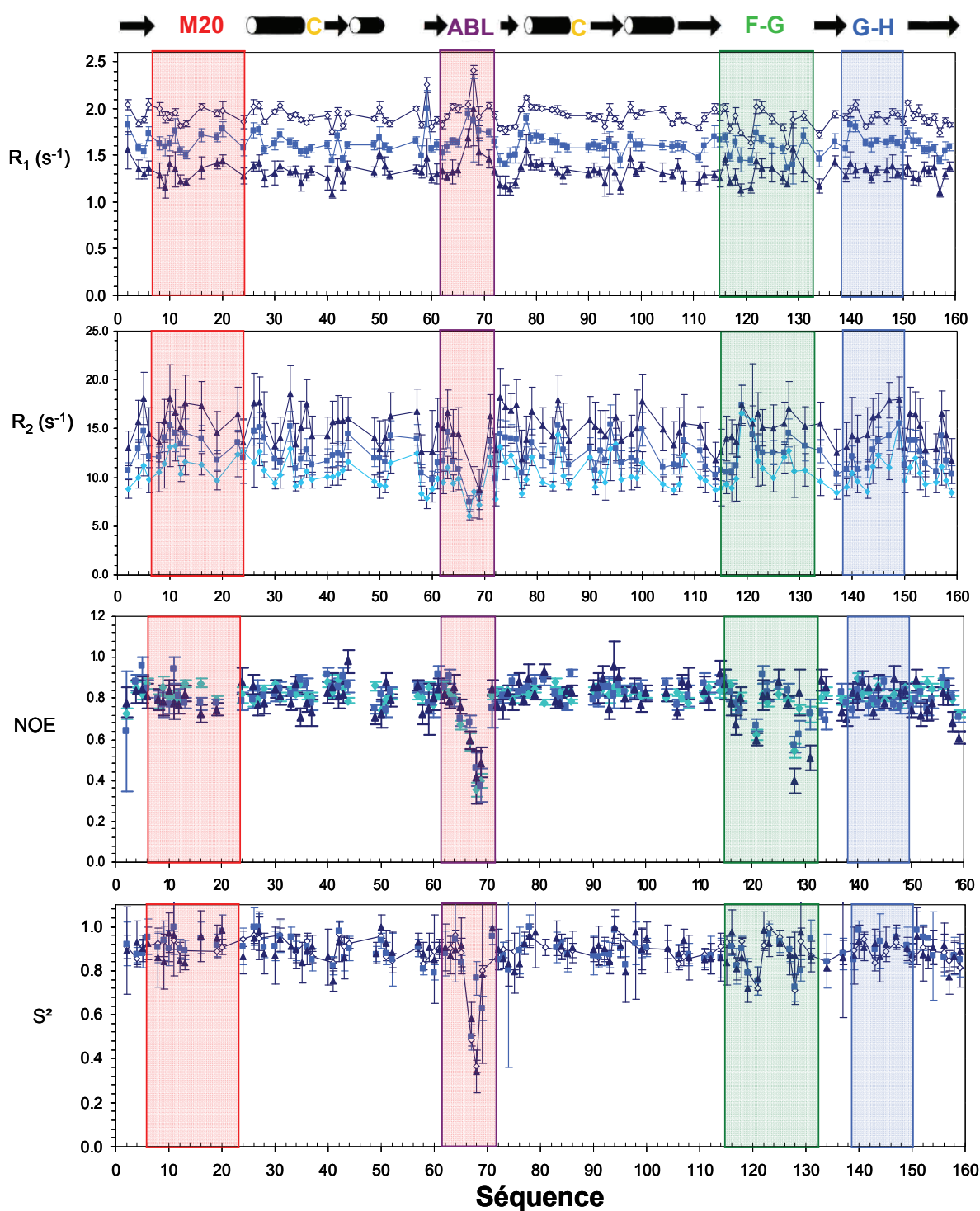


Figure 51 : Données de relaxation R_1 , R_2 et NOE pour différentes concentrations en tréhalose et en GB. Série tréhalose : En blanc, la DHFR dans le tampon KP ; en vert clair, en présence de 0,2 M de tréhalose et en vert foncé, en présence de 0,5 M de tréhalose. Série GB : En bleu ciel, la DHFR dans le tampon KP ; en bleu, en présence de 1 M de GB ; en présence de 2 M GB.

Au delà de l'effet de la viscosité sur les données de relaxation, on n'observe que de très faibles voire pas de modifications locales des données de relaxation avec l'ajout de tréhalose et de GB. De même, les profils S^2 sont similaires et ne permettent pas de dégager des différences dans l'amplitude des mouvements de la DHFR. Par conséquent les osmolytes étudiés n'ont pas d'impact sur la dynamique interne de la DHFR à l'échelle de la pico- à la microseconde. Les effets sur les paramètres de relaxation de la DHFR sont purement liés aux propriétés viscosogènes des osmolytes, et aucun effet moléculaire spécifique lié à la nature des osmolytes n'est observable pour la GB et le tréhalose sur cette échelle de temps.

Des résultats très intéressants ont été obtenus durant l'étude de l'effet du l'encombrement moléculaire sur la cinétique de repliement de l'apocytochrome b562 *via* des expériences RMN de dispersion de relaxation. Il a été observé un ralentissement de la vitesse d'échange de certains résidus en présence de PEG (213). Ces expériences permettent de mesurer expérimentalement le terme d'échange R_{ex} qui est très difficile à estimer dans nos conditions. L'échelle de temps explorée par cette méthode coïncide avec la vitesse de mouvement de la boucle M20 qui permet la libération du produit, l'étape limitante dans le cycle catalytique de la DHFR. Il paraît donc particulièrement judicieux de réaliser ce type d'expérience sur la DHFR. Des acquisitions ont récemment été menées en collaboration avec Carine Van Heijenoort sur la plateforme TGE de Gif sur Yvette (ICSN CNRS, UPR2301). Les données de la DHFR en présence de GB, tréhalose, glycérol et KCl sont encore en phase d'exploitation, les premières analyses rendent compte, comme pour les études des temps de relaxation, d'une baisse de qualité des spectres associée à l'augmentation de la viscosité qui affectent la qualité des données. Néanmoins, nous avons mis en évidence des phénomènes d'échanges chimiques pour des résidus localisés dans les boucles M20, G-H et F-G : Ala9, Leu24, Glu118, Val119, Gly121, Asp127, Glu129, Asp131, Glu133, Ser134, His149 et Arg158 en absence et en présence d'osmolytes. Cette série de résidus nous permet de comparer le mouvement des boucles, essentiel lors de l'activité catalytique de la DHFR, dans différents milieux. Cette méthode de mesure expérimentale du terme R_{ex} nous permet également de vérifier que l'analyse de relaxation ^{15}N classique a tendance à sous estimer le nombre de résidus présentant de l'échange lorsque les données sont de mauvaise qualité.

7 Conclusions et perspectives

Nous avons observé que malgré les propriétés de protection des osmolytes, ils inhibent l'activité de la DHFR pour des concentrations importantes. Néanmoins, cet effet des osmolytes organiques est moins important que l'inhibition de la DHFR induite par le KCl. L'intégrité de la structure de la DHFR en présence de soluté a été vérifiée par diverses méthodes et aucune modification majeure de la structure n'est observable même pour des concentrations allant jusqu'à 3 M en osmolytes.

Lors d'étude sur la stabilité de la DHFR, nous avons constaté que les osmolytes qui stabilisent le plus la DHFR sont également ceux qui inhibent le plus son activité. Il est admis que la stabilité, la dynamique et l'activité des protéines sont inversement corrélées (206, 214). Pour une enzyme présentant des modifications conformationnelles lors de son cycle catalytique, si on assume qu'une augmentation de la stabilité se traduit par une baisse de dynamique interne à température ambiante, on peut alors corréliser la baisse d'activité à cette stabilisation. Cette corrélation est mise en évidence quand on compare des protéines issues d'organismes thermophiles, mésophiles et psychrophiles. Les protéines adaptées au froid ont une faible stabilité, une forte flexibilité et un optimum d'activité à basse température (215, 216). A l'inverse, les protéines thermophiles sont très stables mais peu actives à basse température (215, 217). De même, il est possible de diminuer la stabilité et d'augmenter l'activité des enzymes en ajoutant des concentrations modérées en urée ou en chlorure de guanidinium (218, 219). Pour qu'une enzyme assure sa fonction, sa structure doit être suffisamment stable et compacte, mais suffisamment flexible pour permettre les mouvements conformationnels nécessaires à son activité catalytique (220). Dans notre cas, nous avons bien une relation inverse entre la stabilisation et l'inhibition de la DHFR. Il sera intéressant de mesurer la température de fusion de la DHFR en présence de la GB d'une autre manière, afin de vérifier si son pouvoir stabilisateur se situe bien entre le tréhalose et le KCl. Nous avons constaté avec surprise que le TMAO ne stabilise pas la DHFR, alors qu'il est considéré comme l'osmolyte le plus stabilisateur et est largement utilisé pour replier les protéines qui ne se structurent pas en solution (55, 64).

Après avoir observé l'effet des osmolytes sur l'activité et la stabilité de la DHFR, nous avons étudié les mécanismes qui peuvent être à l'origine de ces variations de propriétés. Nous nous sommes tout d'abord intéressé aux interactions osmolytes-ligands et osmolytes-DHFR qui peuvent avoir un impact important sur l'activité de la DHFR. Nous avons en effet vu que

certaines osmolytes pouvaient interagir avec les ligands ou se fixer dans les sites actifs des enzymes. Si aucune interaction entre les ligands de la DHFR (NADP⁺, NADPH, folate et DHF) et les osmolytes n'est détectable, il est possible d'identifier des modifications de déplacements chimiques des résidus qui sont localisés dans les boucles de la DHFR, en présence de tréhalose et de GB. Pour comparaison, l'effet du KCl est plus important mais aussi plus sélectif puisque des variations de déplacements chimiques majeures autour du site actif de la DHFR indiquent une interaction des ions avec la DHFR.

Lors de l'analyse de la dynamique interne de la DHFR, on remarque une augmentation du temps de corrélation dû à l'augmentation de la viscosité avec l'ajout des osmolytes. Nous observons alors un impact global sur les données de relaxation avec une diminution de R_1 et une augmentation de R_2 . Néanmoins l'effet NOE hétéronucléaire et le paramètre d'ordre S^2 moyen sur l'ensemble de la séquence de la DHFR restent identiques en présence de tréhalose et de GB. On en déduit qu'aucune variation de la flexibilité du squelette protéique de la DHFR n'est observable sur une échelle de temps rapide (ps-ns), en présence de tréhalose ou de GB. De même nous n'avons observé aucune variation locale des données de relaxation avec l'un ou l'autre des osmolytes pouvant faire penser à un effet moléculaire propre à un osmolyte. On en déduit que la dynamique rapide à l'échelle de la ps-ns n'est pas modulée par un effet spécifique des osmolytes.

Par conséquent nous sommes en train d'analyser des expériences d'échange H/D et de relaxation dispersion pour obtenir des informations sur la dynamique de la protéine à une échelle de temps plus lente, compatible avec des mouvements conformationnels de la DHFR lors de son cycle catalytique.

Bibliographie

1. Kashefi, K., and Lovley, D. R. (2003) Extending the upper temperature limit for life, *Science* 301, 934.
2. Csonka, L. N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress, *Microbiol Rev* 53, 121-147.
3. Wood, J. M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors, *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 230-262.
4. Wood, J. M. (2007) Bacterial osmosensing transporters, *Methods Enzymol* 428, 77-107.
5. Roesser, M., and Muller, V. (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences, *Environ Microbiol* 3, 743-754.
6. Li, Y., Moe, P. C., Chandrasekaran, S., Booth, I. R., and Blount, P. (2002) Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from Escherichia coli, *Embo J* 21, 5323-5330.
7. Ajouz, B., Berrier, C., Garrigues, A., Besnard, M., and Ghazi, A. (1998) Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of Escherichia coli cells, *J Biol Chem* 273, 26670-26674.
8. Berrier, C., Coulombe, A., Houssin, C., and Ghazi, A. (1989) A patch-clamp study of ion channels of inner and outer membranes and of contact zones of E. coli, fused into giant liposomes. Pressure-activated channels are localized in the inner membrane, *FEBS Lett* 259, 27-32.
9. el Yaagoubi, A., Kohiyama, M., and Richarme, G. (1994) Localization of DnaK (chaperone 70) from Escherichia coli in an osmotic-shock-sensitive compartment of the cytoplasm, *J Bacteriol* 176, 7074-7078.
10. Martinac, B. (2001) Mechanosensitive channels in prokaryotes, *Cell Physiol Biochem* 11, 61-76.
11. Morbach, S., and Kramer, R. (2002) Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria, *Chembiochem* 3, 384-397.
12. Stumpe, S., Schlösser, A., Schleyer, M., and E.P., B. (1996) K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺-uptake systems. In transport processes in eukaryotic and prokaryotic organisms., *Handbook of Biological Physics*, 473-499.
13. Rhoads, D. B., and Epstein, W. (1978) Cation transport in Escherichia coli. IX. Regulation of K transport, *J Gen Physiol* 72, 283-295.
14. Dosch, D. C., Helmer, G. L., Sutton, S. H., Salvacion, F. F., and Epstein, W. (1991) Genetic analysis of potassium transport loci in Escherichia coli: evidence for three constitutive systems mediating uptake potassium, *J Bacteriol* 173, 687-696.
15. Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E., and Silhavy, T. J. (1996) From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in Escherichia coli, *Mol Microbiol* 20, 911-917.
16. Jung, K., and Altendorf, K. (2002) Towards an understanding of the molecular mechanisms of stimulus perception and signal transduction by the KdpD/KdpE system of Escherichia coli, *J Mol Microbiol Biotechnol* 4, 223-228.
17. Poolman, B., Spitzer, J. J., and Wood, J. M. (2004) Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions, *Biochim Biophys Acta* 1666, 88-104.
18. Kramer, R., and Morbach, S. (2004) BetP of Corynebacterium glutamicum, a transporter with three different functions: betaine transport, osmosensing, and osmoregulation, *Biochim Biophys Acta* 1658, 31-36.
19. Wood, J. M. (2006) Osmosensing by bacteria, *Sci STKE* 2006, pe43.
20. Yancey, P. H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, *J Exp Biol* 208, 2819-2830.

21. Bagnasco, S., Balaban, R., Fales, H. M., Yang, Y. M., and Burg, M. (1986) Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas, *J Biol Chem* 261, 5872-5877.
22. Generlich, O., and Giere, O. (1996) Osmoregulation in two aquatic oligochaetes from habitats with different salinity and comparison to other annelids., *Hydrobiologia* 334, 251-261.
23. Galinski, E. A. (1995) Osmoadaptation in bacteria, *Adv Microb Physiol* 37, 272-328.
24. Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism, *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 334-348.
25. Solomon, E., Berg, L., and Martin, D. (2002) Biology 6th edition, *Brooks/Cole Publishing*.
26. Stewart, C. R., and Lee, J. A. (1974) The role of proline accumulation in halophyts, *Planta* 12, 279-289.
27. Borowitzka, L. J., Kessly, D. S., and Brown, A. D. (1977) The salt relations of *Dunaliella*. Further observations on glycerol production and its regulation, *Arch Microbiol* 113, 131-138.
28. Bowlus, R. D., and Somero, G. N. (1979) Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates, *J Exp Zool* 208, 137-151.
29. Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., and Somero, G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science* 217, 1214-1222.
30. Brown, A. D., and Simpson, J. R. (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols, *J Gen Microbiol* 72, 589-591.
31. Rajagopalan, K. V., Fridovich, I., and Handler, P. (1961) Competitive inhibition of enzyme activity by urea, *J Biol Chem* 236, 1059-1065.
32. Yancey, P. H., and Somero, G. N. (1979) Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes, *Biochem J* 183, 317-323.
33. Bonaventura, J., Bonaventura, C., and Sullivan, B. (1974) Urea tolerance as a molecular adaptation of elasmobranch hemoglobins, *Science* 186, 57-59.
34. Yancey, P. H., and Somero, G. N. (1978) Urea-requiring lactate dehydrogenases of marine elasmobranch fishes, *J. Comp. Physiol.* 125, 135.
35. Lin, T. Y., and Timasheff, S. N. (1994) Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein, *Biochemistry* 33, 12695-12701.
36. Hand, S. C., and Somero, G. N. (1982) Urea and methylamine effects on rabbit muscle phosphofructokinase. Catalytic stability and aggregation state as a function of pH and temperature, *J Biol Chem* 257, 734-741.
37. Pollard, A., and Wyn Jones, R. G. (1979) Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes, *Planta* 144, 291-298.
38. Gordon, M. S., Schmidt-Nielsen, K., and Kelly, H. M. (1961) Osmotic regulation in the crab-eating frog (*Rana cancrivora*). *J. Exp. Biol.* 38, 659.
39. Balinsky, J. B. (1981) Adaptation of nitrogen metabolism to hyperosmotic environment in amphibia., *J. Exp. Zool.* 215, 335.
40. Horne, F. R. (1971) The accumulation of urea by a pulmonate snail during estivation., *Comp. Biochem. Physiol.* 38A, 565-570.
41. Smith, H. W. (1930) Metabolism of the lungfish, *Protopterus aethiopicus*., *J. Biol. Chem.* 88, 97.

42. Record, M. T., Jr., Courtenay, E. S., Cayley, D. S., and Guttman, H. J. (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water, *Trends Biochem Sci* 23, 143-148.
43. Miller, T. J., Hanson, R. D., and Yancey, P. H. (2000) Developmental changes in organic osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 125, 45-56.
44. Olson, J. E., Kreisman, N. R., Lim, J., Hoffman-Kuczynski, B., Schelble, D., and Leasure, J. (2003) Taurine and cellular volume regulation in the hippocampus, *Adv Exp Med Biol* 526, 107-114.
45. Schaffer, S., Azuma, J., Takahashi, K., and Mozaffari, M. (2003) Why is taurine cytoprotective?, *Adv Exp Med Biol* 526, 307-321.
46. Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R. G., and Bohnert, H. (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast, *Plant Physiol* 121, 45-52.
47. Cushman, J. C. (2001) Osmoregulation in plants; implications for agriculture., *Amer. Zool.* 41, 758-769.
48. Storey, K. B., and Storey, J. M. (1996) Natural freezing survival in animals, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27, 365-386.
49. Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., and Goloubinoff, P. (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses, *J Biol Chem* 276, 39586-39591.
50. Brown, A. D. (1976) Microbial water stress, *Bacteriol. Rev.* 40, 803-846.
51. Caldas, T., Demont-caulet, N., Ghazi, A., and Richarme, G. (1999) Thermoprotection by glycine betaine and choline, *Microbiology* 145, 2543-2548.
52. Ignatova, Z., and Gierasch, L. M. (2007) Effects of osmolytes on protein folding and aggregation in cells, *Methods Enzymol* 428, 355-372.
53. Hofmeister, F. (1888) Zur lehre der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24, 247-260.
54. von Hippel, P. H., and Wong, K. Y. (1964) Neutral salts. Generality of their effect on stability of macromolecular conformations, *Science* 145.
55. Street, T. O., Bolen, D. W., and Rose, G. D. (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13997-14002.
56. Greene, R. F., Jr., and Pace, C. N. (1974) Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin, *J Biol Chem* 249, 5388-5393.
57. Back, J. F., Oakenfull, D., and Smith, M. B. (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Biochemistry* 18, 5191-5196.
58. Ou, W. B., Park, Y. D., and Zhou, H. M. (2001) Molecular mechanism for osmolyte protection of creatine kinase against guanidine denaturation, *Eur J Biochem* 268, 5901-5911.
59. Paleg, L. G., Stewart, G. R., and Starr, R. (1985) The effect of compatible solutes on proteins, *Plant Soil* 89, 83-94.
60. Arakawa, T., and Timasheff, S. N. (1985) The stabilization of proteins by osmolytes., *Biophys. J.* 47, 411-414.
61. Harries, D., and Rosgen, J. (2008) A practical guide on how osmolytes modulate macromolecular properties, *Methods Cell Biol* 84, 679-735.
62. Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404, 770-774.

63. Natalello, A., Liu, J., Ami, D., Doglia, S. M., and de Marco, A. (2009) The osmolyte betaine promotes protein misfolding and disruption of protein aggregates, *Proteins* 75, 509-517.
64. Uversky, V. N., Li, J., and Fink, A. L. (2001) Trimethylamine-N-oxide-induced folding of alpha-synuclein, *FEBS. Lett.* 509, 31-35.
65. Bulman, A. L., and Nelson, H. C. (2005) Role of trehalose and heat in the structure of the C-terminal activation domain of the heat shock transcription factor, *Proteins* 58, 826-835.
66. Feng, Y., Liu, D., and Wang, J. (2003) Native-like partially folded conformations and folding process revealed in the N-terminal large fragments of staphylococcal nuclease: a study by NMR spectroscopy, *J Mol Biol* 330, 821-837.
67. Xie, T., Liu, D., Feng, Y., Shan, L., and Wang, J. (2007) Folding stability and cooperativity of the three forms of 1-110 residues fragment of staphylococcal nuclease, *Biophys J* 92, 2090-2107.
68. Goldbaum, F. A., Schwarz, F. P., Eisenstein, E., Cauerhff, A., Mariuzza, R. A., and Poljak, R. J. (1996) The effect of water activity on the association constant and the enthalpy of reaction between lysozyme and the specific antibodies D1.3 and D44.1, *J Mol Recognit* 9, 6-12.
69. Colombo, M. F., Rau, D. C., and Parsegian, V. A. (1992) Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin, *Science* 256, 655-659.
70. Royer, W. E., Jr., Pardanani, A., Gibson, Q. H., Peterson, E. S., and Friedman, J. M. (1996) Ordered water molecules as key allosteric mediators in a cooperative dimeric hemoglobin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14526-14531.
71. Garner, M. M., and Rau, D. C. (1995) Water release associated with specific binding of gal repressor, *Embo J* 14, 1257-1263.
72. Fried, M. G., Stickle, D. F., Smirnakis, K. V., Adams, C., MacDonald, D., and Lu, P. (2002) Role of hydration in the binding of lac repressor to DNA, *J Biol Chem* 277, 50676-50682.
73. Patel, C. N., Noble, S. M., Weatherly, G. T., Tripathy, A., Winzor, D. J., and Pielak, G. J. (2002) Effects of molecular crowding by saccharides on alpha-chymotrypsin dimerization, *Protein Sci* 11, 997-1003.
74. Gonnelli, M., and Strambini, G. B. (1993) Glycerol effects on protein flexibility: a tryptophan phosphorescence study, *Biophys J* 65, 131-137.
75. Wang, A., Robertson, A. D., and Bolen, D. W. (1995) Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A, *Biochemistry* 34, 15096-15104.
76. Foord, R. L., and Leatherbarrow, R. J. (1998) Effect of osmolytes on the exchange rates of backbone amide protons in proteins, *Biochemistry* 37, 2969-2978.
77. Ansari, A., Jones, C. M., Henry, E. R., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (1992) The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational changes, *Science* 256, 1796-1798.
78. Gavish, B., and Werber, M. M. (1979) Viscosity-dependent structural fluctuations in enzyme catalysis, *Biochemistry* 18, 1269-1275.
79. Doster, W. (1983) Viscosity scaling and protein dynamics, *Biophys Chem* 17, 97-103.
80. Doan-Nguyen, V., and Loria, J. P. (2007) The effects of cosolutes on protein dynamics: the reversal of denaturant-induced protein fluctuations by trimethylamine N-oxide, *Protein Sci* 16, 20-29.
81. Zhou, H. X., Rivas, G., and Minton, A. P. (2008) Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences, *Annu Rev Biophys* 37, 375-397.

82. Ellis, R. J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends Biochem. Sci.* 26, 597-604.
83. Ellis, R. J., and Minton, A. P. (2003) Cell biology: join the crowd, *Nature* 425, 27-28.
84. Bolen, D. W., and Baskakov, I. V. (2001) The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding, *J Mol Biol* 310, 955-963.
85. Tanford, C. (1970) Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation, *Adv Protein Chem* 24, 1-95.
86. Tanford, C. (1968) Protein denaturation, *Adv Protein Chem* 23, 121-282.
87. Ebel, C. (2007) Solvent mediated protein-protein interactions *Protein Interactions*, 255-287.
88. Timasheff, S. N. (1998) Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated, *Adv. Protein. Chem.* 51, 355-432.
89. Record, M. T., Jr., Zhang, W., and Anderson, C. F. (1998) Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts, *Adv Protein Chem* 51, 281-353.
90. Timasheff, S. N. (2002) Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration, *Biochemistry* 41, 13473-13482.
91. Timasheff, S. N. (1998) In disperse solution, "osmotic stress" is a restricted case of preferential interactions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7363-7367.
92. Ebel, C., Eisenberg, H., and Ghirlando, R. (2000) Probing protein-sugar interactions, *Biophys J* 78, 385-393.
93. Schellman, J. A. (2003) Protein stability in mixed solvents: a balance of contact interaction and excluded volume, *Biophys J* 85, 108-125.
94. Bolen, D. W. (2004) Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization, *Methods* 34, 312-322.
95. Wu, H. (1995) Studies on denaturation of proteins. XIII. A theory of denaturation. 1931, *Adv Protein Chem* 46, 6-26; discussion 21-25.
96. Schellman, J. A. (1958) The Factors Affecting the Stability of Hydrogen-bonded Polypeptide Structures in Solution, *J. Phys. Chem.* 62, 1485-1494.
97. Davis-Searles, P. R., Saunders, A. J., Erie, D. A., Winzor, D. J., and Pielak, G. J. (2001) Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 271-306.
98. Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation, *Adv Protein Chem* 14, 1-63.
99. Qu, Y., Bolen, C. L., and Bolen, D. W. (1998) Osmolyte-driven contraction of a random coil protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9268-9273.
100. Baskakov, I., and Bolen, D. W. (1998) Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold, *J. Biol. Chem.* 273, 4831-4834.
101. Auton, M., Bolen, D. W., and Rosgen, J. (2008) Structural thermodynamics of protein preferential solvation: osmolyte solvation of proteins, aminoacids, and peptides, *Proteins* 73, 802-813.
102. Batchelor, J. D., Olteanu, A., Tripathy, A., and Pielak, G. J. (2004) Impact of protein denaturants and stabilizers on water structure, *J Am Chem Soc* 126, 1958-1961.
103. Parsegian, V. A., Rand, R. P., Fuller, N. L., and Rau, D. C. (1986) Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces, *Methods Enzymol* 127, 400-416.
104. Parsegian, V. A., Rand, R. P., and Rau, D. C. (1995) Macromolecules and water: probing with osmotic stress, *Methods Enzymol* 259, 43-94.

105. Parsegian, V. A., Rand, R. P., and Rau, D. C. (2000) Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3987-3992.
106. Zimmerberg, J., Bezanilla, F., and Parsegian, V. A. (1990) Solute inaccessible aqueous volume changes during opening of the potassium channel of the squid giant axon, *Biophys J* 57, 1049-1064.
107. Vodyanoy, I., Bezrukov, S. M., and Parsegian, V. A. (1993) Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Size-modulated osmotic action, *Biophys J* 65, 2097-2105.
108. Rand, R. P., Fuller, N. L., Butko, P., Francis, G., and Nicholls, P. (1993) Measured change in protein solvation with substrate binding and turnover, *Biochemistry* 32, 5925-5929.
109. Kornblatt, J. A., and Hoa, G. H. (1990) A nontraditional role for water in the cytochrome c oxidase reaction, *Biochemistry* 29, 9370-9376.
110. Timasheff, S. N. (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9721-9726.
111. Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F., and Record, M. T., Jr. (2000) Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of "osmotic stress" experiments in vitro, *Biochemistry* 39, 4455-4471.
112. Arakawa, T., and Timasheff, S. N. (1982) Stabilization of protein structure by sugars, *Biochemistry* 21, 6536-6544.
113. Lee, J. C., and Timasheff, S. N. (1981) The stabilization of proteins by sucrose, *J Biol Chem* 256, 7193-7201.
114. Xie, G., and Timasheff, S. N. (1997) The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose, *Biophys Chem* 64, 25-43.
115. Shimizu, S. (2004) Estimation of excess solvation numbers of water and cosolvents from preferential interaction and volumetric experiments, *J Chem Phys* 120, 4989-4990.
116. Zaccai, G. (2004) The effect of water on protein dynamics, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 1269-1275; discussion 1275, 1323-1268.
117. Hitchings, G. H., Jr. (1989) Nobel lecture in physiology or medicine--1988. Selective inhibitors of dihydrofolate reductase, *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 303-310.
118. Hitchings, G. H., and Burchall, J. J. (1965) Inhibition of folate biosynthesis and function as a basis for chemotherapy, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 27, 417-468.
119. Huennekens, F. M. (1996) In search of dihydrofolate reductase, *Protein Sci* 5, 1201-1208.
120. Hitchings, G. H., Elion, G. B., Falco, E. A., Russell, P. B., and Vanderwerff, H. (1950) Studies on analogs of purines and pyrimidines, *Ann N Y Acad Sci* 52, 1318-1335.
121. Miller, G. P., and Benkovic, S. J. (1998) Stretching exercises--flexibility in dihydrofolate reductase catalysis, *Chem Biol* 5, R105-113.
122. Burchall, J. J., Ferone, R., and Hitchings, G. H. (1965) Antibacterial Chemotherapy, *Annu Rev Pharmacol* 10, 53-76.
123. Thien, K. R., Blair, J. A., Leeming, R. J., Cooke, W. T., and Melikian, V. (1977) Serum folates in man, *J Clin Pathol* 30, 438-448.
124. Nordberg, M. G. (2001) Approaches to Soft Drug : Analogues of Dihydrofolate Reductase Inhibitors, *Thèse de l'université d'Uppsala (Suède)*.

125. Huennekens, F. M. (1994) The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents, *Adv Enzyme Regul* 34, 397-419.
126. Matthews, D. A., Alden, R. A., Bolin, J. T., Freer, S. T., Hamlin, R., Xuong, N., Kraut, J., Poe, M., Williams, M., and Hoogsteen, K. (1977) Dihydrofolate reductase: x-ray structure of the binary complex with methotrexate, *Science* 197, 452-455.
127. Schnell, J. R., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2004) Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33, 119-140.
128. Baccanari, D., Phillips, A., Smith, S., Sinski, D., and Burchall, J. (1975) Purification and properties of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase, *Biochemistry* 14, 5267-5273.
129. Bolin, J. T., Filman, D. J., Matthews, D. A., Hamlin, R. C., and Kraut, J. (1982) Crystal structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. I. General features and binding of methotrexate, *J Biol Chem* 257, 13650-13662.
130. Bystroff, C., Oatley, S. J., and Kraut, J. (1990) Crystal structures of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: the NADP⁺ holoenzyme and the folate.NADP⁺ ternary complex. Substrate binding and a model for the transition state, *Biochemistry* 29, 3263-3277.
131. Bystroff, C., and Kraut, J. (1991) Crystal structure of unliganded *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. Ligand-induced conformational changes and cooperativity in binding, *Biochemistry* 30, 2227-2239.
132. Fierke, C. A., Johnson, K. A., and Benkovic, S. J. (1987) Construction and evaluation of the kinetic scheme associated with dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 26, 4085-4092.
133. Chen, Y. Q., Kraut, J., Blakley, R. L., and Callender, R. (1994) Determination by Raman spectroscopy of the pK_a of N5 of dihydrofolate bound to dihydrofolate reductase: mechanistic implications, *Biochemistry* 33, 7021-7026.
134. Rod, T. H., and Brooks, C. L., 3rd. (2003) How dihydrofolate reductase facilitates protonation of dihydrofolate, *J Am Chem Soc* 125, 8718-8719.
135. Shrimpton, P., and Allemann, R. K. (2002) Role of water in the catalytic cycle of *E. coli* dihydrofolate reductase, *Protein Sci* 11, 1442-1451.
136. Sawaya, M. R., and Kraut, J. (1997) Loop and subdomain movements in the mechanism of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: crystallographic evidence, *Biochemistry* 36, 586-603.
137. Osborne, M. J., Schnell, J., Benkovic, S. J., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2001) Backbone dynamics in dihydrofolate reductase complexes: role of loop flexibility in the catalytic mechanism, *Biochemistry* 40, 9846-9859.
138. Osborne, M. J., Venkitakrishnan, R. P., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2003) Diagnostic chemical shift markers for loop conformation and substrate and cofactor binding in dihydrofolate reductase complexes, *Protein Sci* 12, 2230-2238.
139. Cayley, P. J., Dunn, S. M., and King, R. W. (1981) Kinetics of substrate, coenzyme, and inhibitor binding to *Escherichia coli* dihydrofolate reductase, *Biochemistry* 20, 874-879.
140. Dunn, S. M., Batchelor, J. G., and King, R. W. (1978) Kinetics of ligand binding to dihydrofolate reductase: binary complex formation with NADPH and coenzyme analogues, *Biochemistry* 17, 2356-2364.
141. Dunn, S. M., and King, R. W. (1980) Kinetics of ternary complex formation between dihydrofolate reductase, coenzyme, and inhibitors, *Biochemistry* 19, 766-773.

142. Chen, J. T., Taira, K., Tu, C. P., and Benkovic, S. J. (1987) Probing the functional role of phenylalanine-31 of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 26, 4093-4100.
143. Penner, M. H., and Frieden, C. (1985) Substrate-induced hysteresis in the activity of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase, *J Biol Chem* 260, 5366-5369.
144. Falzone, C. J., Cavanagh, J., Cowart, M., Palmer, A. G., 3rd, Matthews, C. R., Benkovic, S. J., and Wright, P. E. (1994) ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments, secondary structure, and the conformation of substrate in the binary folate complex of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase, *J Biomol NMR* 4, 349-366.
145. Rajagopalan, P. T., Zhang, Z., McCourt, L., Dwyer, M., Benkovic, S. J., and Hammes, G. G. (2002) Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13481-13486.
146. Kitahara, R., Sareth, S., Yamada, H., Ohmae, E., Gekko, K., and Akasaka, K. (2000) High pressure NMR reveals active-site hinge motion of folate-bound *Escherichia coli* dihydrofolate reductase, *Biochemistry* 39, 12789-12795.
147. Li, L., Falzone, C. J., Wright, P. E., and Benkovic, S. J. (1992) Functional role of a mobile loop of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase in transition-state stabilization, *Biochemistry* 31, 7826-7833.
148. Farnum, M. F., Magde, D., Howell, E. E., Hirai, J. T., Warren, M. S., Grimsley, J. K., and Kraut, J. (1991) Analysis of hydride transfer and cofactor fluorescence decay in mutants of dihydrofolate reductase: possible evidence for participation of enzyme molecular motions in catalysis, *Biochemistry* 30, 11567-11579.
149. Falzone, C. J., Wright, P. E., and Benkovic, S. J. (1994) Dynamics of a flexible loop in dihydrofolate reductase from *Escherichia coli* and its implication for catalysis, *Biochemistry* 33, 439-442.
150. Polshakov, V. I. (2001) Dihydrofolate reductase: structural aspects of mechanisms of enzyme catalysis and inhibition, *Russ. Chem. Bull., Int Ed.* 50, 1733-1751.
151. Palmer, A. G., 3rd. (1996) Protein NMR spectroscopy - principles and Practice, chapter Relaxation and dynamic processes, *edition academic press inc.*
152. McElheny, D., Schnell, J. R., Lansing, J. C., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2005) Defining the role of active-site loop fluctuations in dihydrofolate reductase catalysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5032-5037.
153. Boehr, D. D., McElheny, D., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2006) The dynamic energy landscape of dihydrofolate reductase catalysis, *Science* 313, 1638-1642.
154. Cameron, C. E., and Benkovic, S. J. (1997) Evidence for a functional role of the dynamics of glycine-121 of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase obtained from kinetic analysis of a site-directed mutant, *Biochemistry* 36, 15792-15800.
155. Renaud, S. (2003) Impact des osmolytes organiques sur l'activité catalytique des protéines, *Thèse de l'université de Rennes 1.*
156. Wright, D. B., Banks, D. D., Lohman, J. R., Hilsenbeck, J. L., and Gloss, L. M. (2002) The effect of salts on the activity and stability of *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii* dihydrofolate reductases, *J Mol Biol* 323, 327-344.
157. Stone, S. R., and Morrison, J. F. (1982) Kinetic mechanism of the reaction catalyzed by dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 21, 3757-3765.
158. Provencher, S. W., and Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry* 20, 33-37.
159. Brahms, S., and Brahms, J. (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism, *J Mol Biol* 138, 149-178.

160. Klewpatinond, M., and Viles, J. H. (2007) Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu²⁺ and Ni²⁺ histidine complexes: applications to the prion protein, *FEBS Lett* 581, 1430-1434.
161. Sreerama, N., and Woody, R. W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism, *Anal Biochem* 209, 32-44.
162. Kusunoki, H., Minasov, G., Macdonald, R. I., and Mondragon, A. (2004) Independent movement, dimerization and stability of tandem repeats of chicken brain alpha-spectrin, *J Mol Biol* 344, 495-511.
163. Weber, G., and Shinitzky, M. (1970) Failure of Energy Transfer between Identical Aromatic Molecules on Excitation at the Long Wave Edge of the Absorption Spectrum, *Proc Natl Acad Sci U S A* 65, 823-830.
164. Vivian, J. T., and Callis, P. R. (2001) Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins, *Biophys J* 80, 2093-2109.
165. Williamson, M. P., Havel, T. F., and Wuthrich, K. (1985) Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry, *J Mol Biol* 182, 295-315.
166. Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1991) Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure, *J Mol Biol* 222, 311-333.
167. Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994) Chemical shifts as a tool for structure determination, *Methods Enzymol* 239, 363-392.
168. Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology, *J Biomol NMR* 13, 289-302.
169. Ayed, A., Mulder, F. A., Yi, G. S., Lu, Y., Kay, L. E., and Arrowsmith, C. H. (2001) Latent and active p53 are identical in conformation, *Nat Struct Biol* 8, 756-760.
170. Gsponer, J., Hopearuoho, H., Whittaker, S. B., Spence, G. R., Moore, G. R., Paci, E., Radford, S. E., and Vendruscolo, M. (2006) Determination of an ensemble of structures representing the intermediate state of the bacterial immunity protein Im7, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 99-104.
171. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J Biomol NMR* 6, 277-293.
172. Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) NMRview: A computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J Biomol NMR* 4, 603-614.
173. Stejskal, E. O., and Tanner, J. E. (1965) Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient, *J. Chem. Phys.* 41, 288-292.
174. Tanner, J. E. (1990) The use of the stimulated echo in NMR diffusion studies, *J. Chem. Phys.* 52, 2523-2526.
175. Johnson, C. S. (1999) Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles, applications, *Prog. NMR Spectrosc.* 34, 203-256.
176. Meyer, B., and Peters, T. (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors, *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 864-890.
177. Balaram, P., Bothner-By, A. A., and Dadok, J. (1972) Negative nuclear Overhauser effects as probes of macromolecular structure, *J Am Chem Soc* 94, 4015-4017.
178. Balaram, P., Bothner-By, A. A., and Breslow, E. (1973) Nuclear magnetic resonance studies of the interaction of peptides and hormones with bovine neurophysin, *Biochemistry* 12, 4695-4704.

179. Dalvit, C., Cottens, S., Ramage, P., and Hommel, U. (1999) Half-filter experiments for assignment, structure determination and hydration analysis of unlabelled ligands bound to $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labelled proteins *J. Biomol. NMR* 8, 31-41.
180. Dalvit, C., Pevarello, P., Tato, M., Veronesi, M., Vulpetti, A., and Sundstrom, M. (2000) Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water, *J Biomol NMR* 18, 65-68.
181. Mouro, C., Bondon, A., Jung, C., Hui Bon Hoa, G., De Certaines, J. D., Spencer, R. G., and Simonneaux, G. (1999) Proton nuclear magnetic resonance study of the binary complex of cytochrome P450cam and putidaredoxin: interaction and electron transfer rate analysis, *FEBS Lett* 455, 302-306.
182. Hyde, E. I., Birdsall, B., Roberts, G. C., Feeney, J., and Burgen, A. S. (1980) Proton nuclear magnetic resonance saturation transfer studies of coenzyme binding to *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase, *Biochemistry* 19, 3738-3746.
183. Birdsall, B., Roberts, G. C., Feeney, J., Dann, J. G., and Burgen, A. S. (1983) Trimethoprim binding to bacterial and mammalian dihydrofolate reductase: a comparison by proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance, *Biochemistry* 22, 5597-5604.
184. Cayley, P. J., Albrand, J. P., Feeney, J., Roberts, G. C., Piper, E. A., and Burgen, A. S. (1979) Nuclear magnetic resonance studies of the binding of trimethoprim to dihydrofolate reductase, *Biochemistry* 18, 3886-3895.
185. Fischer, M. W., Zeng, L., Majumdar, A., and Zuiderweg, E. R. (1998) Characterizing semilocal motions in proteins by NMR relaxation studies, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8016-8019.
186. Korzhnev, D. M., Billeter, M., Arseniev, A. S., and Orekhov, V. Y. (2001) NMR studies of Brownian tumbling and internal motions in proteins, *Prog. NMR Spectrosc.* 38, 197-266.
187. Lallemand, J. Y., and Guittet, E. Spectroscopie: Résonance Magnétique Nucléaire, *Cours de RMN (Master IFSB, Ecole polytechnique)*.
188. Van Heijenoort, C. RMN et mouvements moléculaires, *Cours de RMN (Master IFSB, Paris XI)*.
189. Palmer, A. G., 3rd, Kroenke, C. D., and Loria, J. P. (2001) Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules, *Methods Enzymol* 339, 204-238.
190. Abragam, A. (1961) Principles of Nuclear Magnetism, *Oxford University Press*.
191. Fischer, M. W., Majumdar, A., and Zuiderweg, E. R. (1998) Protein NMR relaxation: theory, applications and outlook, *Prog. NMR Spectrosc.* 33, 207-272.
192. Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation, *Biochemistry* 33, 5984-6003.
193. Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A., and Vetterling, W. T. (1986) *Numerical recipes. Cambridge*.
194. Lipari, G., and Szabo, A. (1982a) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. Theory and range of validity., *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546.
195. Lipari, G., and Szabo, A. (1982b) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. Theory and range of validity., *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4559.

196. Kay, L. E., Torchia, D. A., and Bax, A. (1989) Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease, *Biochemistry* 28, 8972-8979.
197. Clore, G. M., Driscoll, P. C., Wingfield, P. T., and Gronenborn, A. M. (1990a) Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 beta using two-dimensional inverse detected heteronuclear ^{15}N - ^1H NMR spectroscopy, *Biochemistry* 29, 7387-7401.
198. Clore, G. M., Szabo, A., Bax, A., Lewis, E. K., Driscoll, P. C., and Gronenborn, A. M. (1990b) Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4989-4991.
199. Dosset, P., Hus, J. C., Blackledge, M., and Marion, D. (2000) Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data, *J Biomol NMR* 16, 23-28.
200. Dosset, P., Hus, J. C., Marion, D., and Blackledge, M. (2001) A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings, *J Biomol NMR* 20, 223-231.
201. Mandel, A. M., Akke, M., and Palmer, A. G., 3rd. (1996) Dynamics of ribonuclease H: temperature dependence of motions on multiple time scales, *Biochemistry* 35, 16009-16023.
202. Baccanari, D. P., Averett, D., Briggs, C., and Burchall, J. (1977) Escherichia coli dihydrofolate reductase: isolation and characterization of two isozymes, *Biochemistry* 16, 3566-3572.
203. Ohmae, E., Kurumiya, T., Makino, S., and Gekko, K. (1996) Acid and thermal unfolding of Escherichia coli dihydrofolate reductase, *J Biochem* 120, 946-953.
204. Long, F., McElheny, D., Jiang, S., Park, S., Caffrey, M. S., and Fung, L. W. (2007) Conformational change of erythroid alpha-spectrin at the tetramerization site upon binding beta-spectrin, *Protein Sci* 16, 2519-2530.
205. Uribe, S., and Sampedro, J. G. (2003) Measuring Solution Viscosity and its Effect on Enzyme Activity, *Biol Proced Online* 5, 108-115.
206. Roca, M., Liu, H., Messer, B., and Warshel, A. (2007) On the relationship between thermal stability and catalytic power of enzymes, *Biochemistry* 46, 15076-15088.
207. Achilles, W., Cumme, G. A., and Hoppe, H. (1973) Acid dissociation and complex formation of glycolytic metabolites with magnesium, potassium and sodium. Determination of acidity and stability constants by pH titration, *Acta Biol Med Ger* 31, 763-770.
208. Riordan, J. F., McElvany, K. D., and Borders, C. L., Jr. (1977) Arginyl residues: anion recognition sites in enzymes, *Science* 195, 884-886.
209. Jolival, C., Bockmann, A., Ries-Kautt, M., Ducruix, A., and Guittet, E. (1998) Characterization of the interaction between bovine pancreatic trypsin inhibitor and thiocyanate by NMR, *Biophys Chem* 71, 221-234.
210. Einstein, A. (1905) *Ann. Phys.* 17, 549-560.
211. Zeeb, M., Jacob, M. H., Schindler, T., and Balbach, J. (2003) ^{15}N relaxation study of the cold shock protein CspB at various solvent viscosities, *J Biomol NMR* 27, 221-234.
212. Korchuganov, D. S., Gagnidze, I. E., Tkach, E. N., Schulga, A. A., Kirpichnikov, M. P., and Arseniev, A. S. (2004) Determination of protein rotational correlation time from NMR relaxation data at various solvent viscosities, *J Biomol NMR* 30, 431-442.

213. Ai, X., Zhou, Z., Bai, Y., and Choy, W. Y. (2006) ^{15}N NMR spin relaxation dispersion study of the molecular crowding effects on protein folding under native conditions, *J Am Chem Soc* 128, 3916-3917.
214. Tang, K. E., and Dill, K. A. (1998) Native protein fluctuations: the conformational-motion temperature and the inverse correlation of protein flexibility with protein stability, *J Biomol Struct Dyn* 16, 397-411.
215. Collins, T., Meuwis, M. A., Gerday, C., and Feller, G. (2003) Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments, *J. Mol. Biol.* 328, 419-428.
216. Davail, S., Feller, G., Narinx, E., and Gerday, C. (1994) Cold adaptation of proteins. Purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the antarctic psychrophile *Bacillus* TA41, *J Biol Chem* 269, 17448-17453.
217. Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor, and Petsko, G. A. (1998) Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7406-7411.
218. Hegde, S. S., Kumar, A. R., Ganesh, K. N., Swaminathan, C. P., and Khan, M. I. (1998) Thermodynamics of ligand (substrate/end product) binding to endoxylanase from *Chainia* sp. (NCL-82-5-1): isothermal calorimetry and fluorescence titration studies, *Biochim Biophys Acta* 1388, 93-100.
219. Fan, Y. X., Ju, M., Zhou, J. M., and Tsou, C. L. (1995) Activation of chicken liver dihydrofolate reductase in concentrated urea solutions, *Biochim Biophys Acta* 1252, 151-157.
220. Shoichet, B. K., Baase, W. A., Kuroki, R., and Matthews, B. W. (1995) A relationship between protein stability and protein function, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 452-456.

Chapitre 2

Peptides et pseudopeptides antimicrobiens en environnement membranaire

Ces travaux ont été menés en collaboration avec l'équipe de Joël Henry du laboratoire de biologie et biotechnologies marines de l'UMR IFREMER-Université de Caen Basse-Normandie, le laboratoire de Yannick Fleury du laboratoire de microbiologie appliquée de Quimper (LUMAQ, Université de Bretagne Ouest), le groupe de Michèle Baudy Floc'h de l'équipe ICMV (Ingénierie chimique et Molécules pour le Vivant) de l'UMR CNRS 6226 Sciences chimiques de Rennes et Véronique Vié de l'équipe de biophysique de l'UMR CNRS 6250 Institut de physique de Rennes. Les fichiers paramètres et topologies des acides aminés aza- β 3 ont été générés avec Françoise Vovelle de l'équipe RMN et modélisation des peptides et des protéines du centre de biophysique moléculaire, UPR CNRS 4031, à Orléans.

1. Introduction

Les peptides antimicrobiens sont des constituants majeurs de la réponse immunitaire innée dans le règne animal (1, 2). Ils sont produits par les invertébrés (insectes (3), crustacés, mollusques (4), les vertébrés (5), (mammifères (6), reptiles, amphibiens (7), poissons (8), oiseaux (9), etc.) mais ils peuvent également être produits par des végétaux (10), des champignons (11) et même des bactéries et des levures (12). Ils constituent la première ligne de défense contre les agressions extérieures. Ils peuvent être sécrétés de manière constitutive par des cellules sécrétrices ou leur production peut être induite par une infection externe. Leurs spectres d'activité peuvent être limités à quelques espèces de microorganismes mais la plupart possèdent de larges spectres d'activité qui s'étendent de la majorité des espèces bactériennes et fongiques aux protozoaires. Certains sont même actifs sur les virus enveloppés et les cellules cancéreuses (13). Ainsi de nouveaux médicaments sont développés à base de peptides comme par exemple le « lupuzor » qui représente un réel espoir pour le traitement du lupus érythémateux disséminé ou le peptide HB19 qui possède, entre autre, des propriétés anticancéreuses (14). De plus, les peptides antimicrobiens sont des candidats sérieux pour faire face à l'apparition de microorganismes multi-résistants aux antibiotiques (15).

Les peptides antimicrobiens présentent une grande diversité de séquences ou de structures secondaires mais se caractérisent néanmoins par des propriétés communes. Ils sont principalement de petites tailles (jusqu'à 50 acides aminés), possèdent une charge nette positive et une large proportion d'acides aminés hydrophobes (30 à 50% de la séquence). Ils adoptent pour la plupart une conformation amphiphile avec une partie polaire et un domaine hydrophobe. Plus de 1000 peptides antimicrobiens sont répertoriés dans deux bases de

données, l'AMSDb (*Antimicrobial Sequence Database*⁷) et l'APD (16) (*Antimicrobial Peptide Database*⁸).

Je vais présenter sommairement les différentes classes de peptides antimicrobiens et décrire les différents modes d'action proposés dans la littérature. Cette présentation est en partie inspirée de l'introduction de la thèse de M. Laurencin (17). Enfin, nous verrons les techniques et les modèles de membranes qui sont généralement utilisés pour étudier la structure des peptides en environnement membranaire modèle.

1.1 Les différentes classes de peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens, au sein d'une même espèce, peuvent avoir des structures très différentes tout en ayant des similarités importantes avec ceux d'autres organismes. Ils ont donc été classés en fonction de leur composition en acides aminés et de leurs structures tridimensionnelles. Je présenterai tout d'abord, les différentes classes de peptides antimicrobiens naturels, puis les peptides antimicrobiens *de novo* et enfin les pseudopeptides antimicrobiens.

1.1.1 Les peptides antimicrobiens naturels

La majorité des peptides antimicrobiens déposés dans les bases de données sont des peptides isolés d'organismes vivants. La plupart de ces peptides appartiennent à la famille des peptides cationiques linéaires composés d'une hélice α (2). Ce sont des peptides qui adoptent une hélice amphipathique au contact des membranes. Leurs spectres d'activité sont très larges et certains sont hémolytiques ou cytotoxiques. Ce sont les premiers peptides antimicrobiens à avoir été étudiés. Dès 1962, les propriétés antimicrobiennes et hémolytiques de la bombinine, isolée du crapaud *Bombina variegata*, ont été mises en évidence (18, 19). Quelques années plus tard, la mellitine très cytotoxique est extraite du venin de l'abeille domestique *Apis mellifera* (20, 21). A partir des années 80, de nombreux peptides de cette famille, présents dans de nombreuses espèces, vont être étudiés. On peut citer les cécropines (22) issue du papillon de nuit *Hyalophora cecropia*, les magainines (23) extraites de la peau de l'amphibien *Hyalophora cecropia* (Figure 52), les dermaseptines du genre *Phyllomedusa* (24), toute une

⁷ <http://www.bbcm.units.it/~tossi/amsdb.html>

⁸ <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

gamme de peptides de l'alaméthicine produite par un champignon aux cathélicidines présentes chez l'Homme (25).

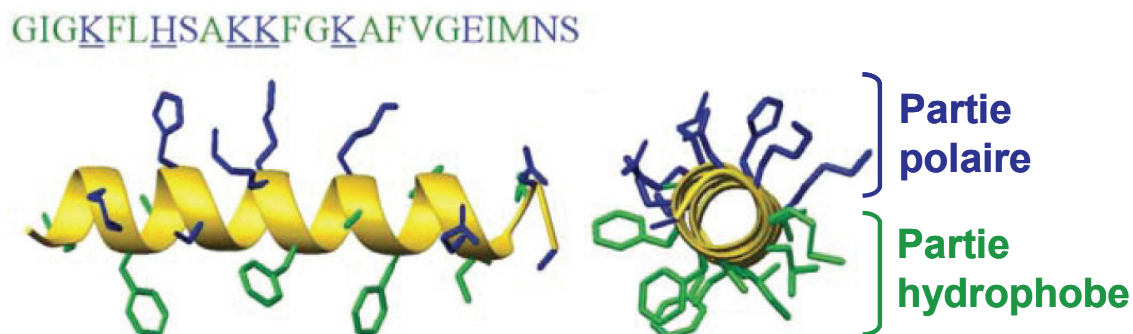


Figure 52 : Séquence et structure tridimensionnelle de la magainine 2 (PDB: 2MAG).

Les peptides qui possèdent des ponts disulfures riches en cystéines forment la deuxième grande classe de peptides dont les défensines sont les principaux représentants. Ces peptides sont généralement plus longs que les peptides en hélice α et peuvent adopter diverses conformations. Ils peuvent être composés de feuillets β disposés en épingle à cheveux ou de structures mixtes α/β . Cette famille de peptides est ensuite divisée en plusieurs catégories suivant le nombre de ponts disulfures (Figure 53). Par exemple, la thanatine d'insecte (26), les brevinines et tigrinines des amphibiens (7) et la bacténécine chez les mammifères (27) sont composés d'un seul pont disulfure. La gomésine de la tarentule *Acanthoscuria gomesina* (28) ou encore les protégrines de porcs (29) possèdent deux ponts disulfures. Ces peptides à un ou deux ponts disulfures adoptent une conformation en épingle à cheveux. Les défensines (5, 10, 30, 31), composées de trois ou quatre ponts disulfures, sont présentes chez les invertébrés, les plantes, les oiseaux et les mammifères. Elles ont des spectres d'activité très variés, néanmoins certaines défensines comme la drosomyicine (32) de la drosophile ont une spécificité pour les champignons.

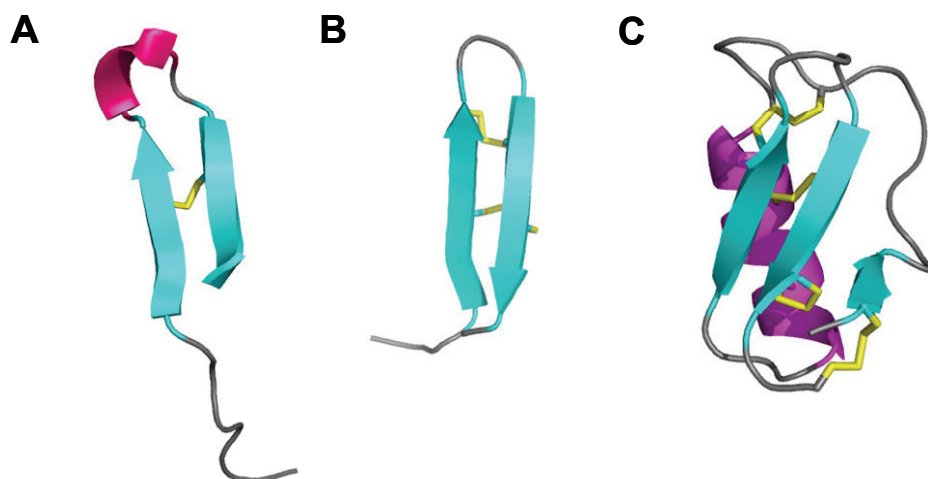


Figure 53 : Structures tridimensionnelles de la (A) thanatine de *Podisus* de la punaise *Podisus maculiventris* (PDB: 8TFV) (B) protégrine 1 du porc *Sus scrofa* (PDB: 1PG1), (C) Défensine de la drosophile *Drosophila melanogaster* (PDB: MYNG).

Une autre catégorie de peptides rassemble les peptides dont la composition est riche en un ou deux types d'acides aminés, certains exemples sont présentés dans la Table 1 : Différentes séquences de peptides antimicrobiens riches en un ou deux types d'acides aminés. Ces peptides sont relativement peu structurés.

| Peptides | Espèces | Acides aminés majoritaires |
|--------------------------------|---------|----------------------------|
| Tritrpticine (33) | Porc | 30 % R et 23 % W |
| Prophénine 1 (34) | Porc | 50 % P et 19 % F |
| PR39 (35) | Porc | 49 % P et 26 % R |
| Indolicine (36) | Bœuf | 38 % W |
| Bacténécines Bac5 et Bac7 (37) | Bœuf | + de 45 % P et 20 % R |
| Histatine 5 (38) (39) | Homme | 29 % H |

Table 1 : Différentes séquences de peptides antimicrobiens riches en un ou deux types d'acides aminés.

Une autre classe de peptides antimicrobiens rassemble ceux qui possèdent des acides aminés que l'on rencontre rarement, elle est divisée en deux familles : les lantibiotiques et les peptaïbols. Les lantibiotiques issus des bactéries peuvent avoir dans leurs séquences, des acides aminés D, des lanthionines qui forment des ponts thioesters et des deshydroaminoacides (12, 40). Ces résidus peu communs résultent de modifications post-traductionnelles. La nisine (41), la subtiline (42), et l'apidermine (43) sont des exemples de lantibiotiques. Les peptaïbols (44) ont été isolés à partir des champignons, ils possèdent une activité sur les levures et les bactéries (Figure 54). Des acides aminés peu usuels comme

l'isovaline, l' α méthyl/éthyl alanine ou l'hydroxyproline composent l'alaméthicine (45-47), les longibrachines, les trichorzianines (48, 49) etc.

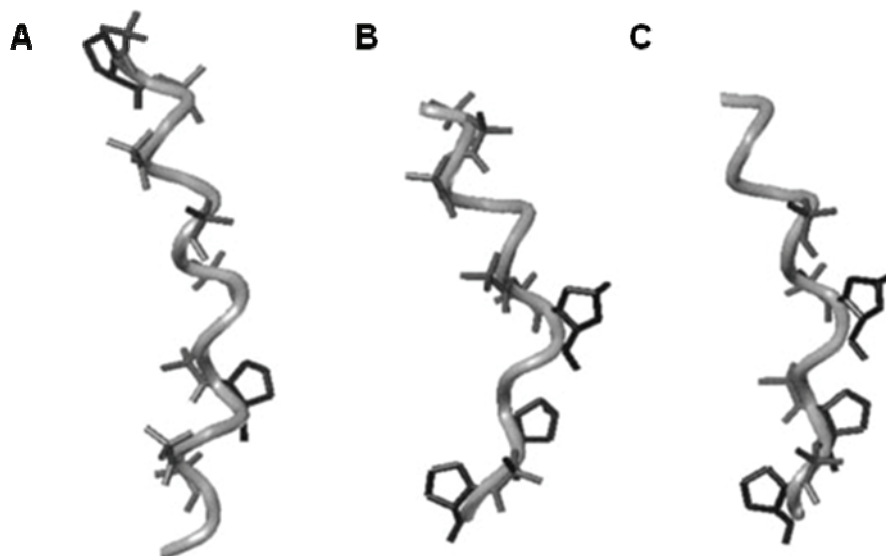


Figure 54 : Comparaison des structures tridimensionnelles de peptaïbols, (A) l'alaméthicine de *Trichoderma viridae* (PDB: 1AMT), (B) la zervamicine II-B de *Emericellopsis salmosynnemata* (PDB: 1IH9) et de (C) l'antiamoebine 1 de *Emericellopsis poonensis* (PDB: 1JOH). (Les chaînes latérales des résidus Aib sont en gris et Pro en noir) (50)

Une dernière catégorie a été créée pour les peptides qui ne correspondent à aucun des critères précédents, c'est la classe des peptides antimicrobiens atypiques. Ces peptides peuvent être anioniques ou posséder des structures originales, des chaînes alkyles ou être cycliques. Par exemple, on y trouve des peptides anioniques dérivés de neuropeptides comme l'enkélytine ou le peptide B et certains sont phosphorylés (51-53). La gramicidine S est un cyclodecapeptide, constituée de résidus peu communs comme l'ornithine et des D-phénylalanines, elle s'autoassocie en feuillets β antiparallèles au niveau des membranes et les déstabilise (54, 55). La surfactine présentée Figure 55 est un peptide cyclique composé d'une chaîne alkyle produit par *Bacillus subtilis*. (56, 57). On remarque que les chaînes latérales des deux résidus chargés négativement sont dirigées à l'opposé de la majorité des chaînes latérales hydrophobes lui conférant une amphiphilie à l'origine de ses propriétés surfactantes.

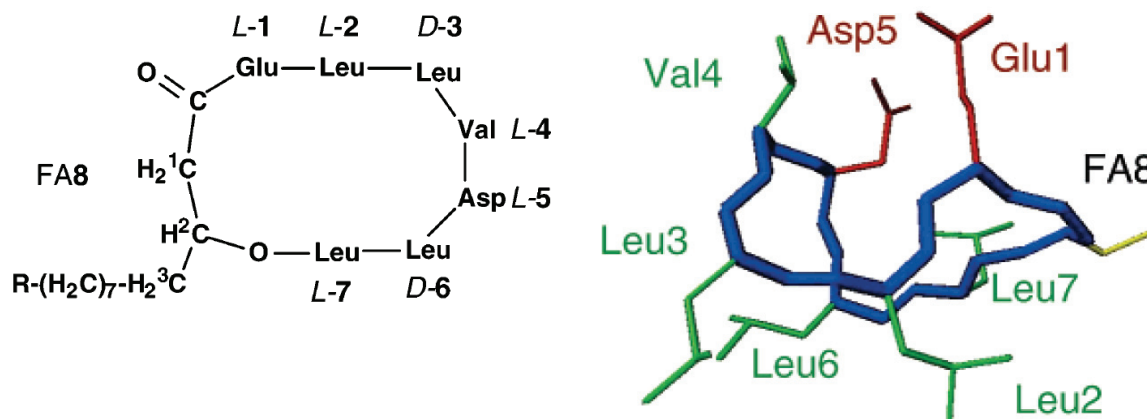


Figure 55 : Séquence et structure tridimensionnelle de la surfactine de *Bacillus subtilis*. La surfactine présentée ci-dessus est un peptide cyclique composé d'une chaîne alkyle. (58)

1.1.2 Les peptides synthétiques (de novo)

Le développement de la synthèse chimique de peptides naturels sur support solide (59, 60) a permis d'obtenir des quantités de peptides bien supérieures à celles obtenues par extraction à partir d'organismes vivants. Cela a permis de multiplier les expériences dans le but de mieux caractériser et de comprendre le mode d'action de ces peptides. De plus, la possibilité de substituer des acides aminés dans les séquences de peptides naturels a permis d'obtenir des peptides bien plus actifs que les peptides naturels antimicrobiens. Afin d'optimiser toujours plus l'activité, la sélectivité et la résistance des peptides aux peptidases, on a pu faire subir aux acides aminés des modifications chimiques de plus en plus complexes et des peptides antimicrobiens linéaires ont, par exemple, été cyclisés. De nombreux types de résidus non naturels ont été incorporés comme les acides aminés D, des résidus avec des chaînes alkyles ou possédant des chaînes latérales non protéinogènes.

Des criblages de séquences ont permis de déceler l'activité antimicrobienne potentielle de nombreux peptides. Ainsi, devant le grand nombre de peptides néosynthétisés, il est impossible de faire une liste exhaustive. J'évoquerai donc plutôt les types de peptides *de novo* les plus représentatifs.

Il y a tout d'abord, les peptides qui ont subi des substitutions d'acides aminés. La magainine 2, présentée précédemment comme exemple de peptide cationique à hélice α , a subi de nombreuses modifications chimiques. Par exemple, l'ensemble de la séquence de la magainine 2 a été remplacée par des acides aminés de configuration D. Bien que cet énantiomère possède un seuil d'activité *in vitro* comparable à celui du peptide naturel, il est

néanmoins beaucoup plus résistant aux peptidases (61). De plus, le fait que les énantiomères L et D aient la même activité antimicrobienne met en évidence le caractère non chiral de la reconnaissance de la magainine 2 pour les microorganismes. Ceci suggère que ce peptide interagit avec les lipides plutôt qu'avec des récepteurs membranaires sensibles à la chiralité de leurs partenaires.

La magainine a subi des mutations ponctuelles afin d'étudier l'effet de la charge sur son activité et son interaction avec les lipides. Ainsi, une phénylalanine a été remplacée par un tryptophane (F12W) pour étudier l'enfouissement de la magainine dans une bicouche (62). Comme autre exemple, on peut citer la synthèse de peptides hybrides comme la cécropine A/magainine 2 qui a une activité antitumorale intéressante et une activité hémolytique réduite (63, 64).

L'élucidation de modes d'action et la caractérisation des résidus essentiels dans l'activité de peptides ont mené à la synthèse de séquences originales composées de répétition de motifs. Par exemple, certaines séquences composées de motifs constitués de sept résidus (KLGKKLG)_n, (KALKALK)_n, (KLAKLAK)_n,... forment des hélices α parfaitement amphiphiles. De tels peptides se structurent en environnement membranaire et sont actifs uniquement si n est supérieur à 1 (65). Ces séquences peuvent être fusionnées avec des séquences de peptides existantes (66). Des peptides composés uniquement de leucines et de lysines avec des chiralités L ou D, comme le D-K₆-L₉, présentent des activités antitumorales remarquables diminuant la densité des microvaisseaux irriguant les tumeurs et augmentant la nécrose des cellules tumorales (67). D'autres motifs peptidiques sont synthétisés dont certains conduisent d'ailleurs à la formation de brin β comme le peptide (KIGAKI)₃-NH₂ en présence de bicouche lipidiques anioniques (68).

Certains peptides naturels possèdent des chaînes alkyles hydrophobes comme les polymixines (69), la daptinomycine (70) ou encore les syringotoxines (71). La chaîne lipophile est nécessaire à l'activité antimicrobienne des ces peptides. Par conséquent, de nombreux groupes ont ajouté de longues chaînes aliphatiques sur des séquences de peptides naturels afin d'augmenter leur hydrophobie et leur capacité d'association avec les membranes biologiques. Les magainines (72), la cathépsine G (73), ainsi que des fragments de la lactoferrine humaine dont la lactoferricine B (74, 75) ont notamment été transformés suivant cette stratégie. En plus d'augmenter l'affinité pour les membranes biologiques, ces chaînes peuvent être à l'origine de la structuration des peptides. Des peptides très courts avec seulement quelques acides aminés

(76), composés de quatre acides aminés et même le dipeptide KK avec une chaîne palmitoyle possèdent des activités bactéricides sur des bactéries Gram positif (77).

Un dernier exemple de peptide *de novo* est la cyclisation de peptides linéaires comme les peptides du type Ac-RRWWRF-NH₂ (78). La cyclisation de ces hexapeptides augmente sensiblement leur activité antimicrobienne. Cette activité est définie par la concentration molaire inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration minimale en peptide inhibant la croissance bactérienne. La CMI de ce peptide linéaire est de 30 µM pour *B. subtilis* (Gram positif) et 100 µM pour *E. coli* (Gram négatif), après cyclisation elle chute à 10 µM pour les deux types de bactérie. Même si l'activité hémolytique est également augmentée, la concentration hémolytique est bien supérieure aux seuils d'activité antimicrobienne de ces peptides. L'incorporation d'acides aminés D a une fois de plus peu d'impact sur l'activité *in vitro* de ces peptides, mais permet une augmentation significative de la résistance aux protéases. D'autres peptides cycliques ont été développés à partir de lysines, leucines et tryptophanes de configurations alternées L et D. Ces hexa- ou octapeptides ont la capacité de s'autoassocier en feuillets β pour former des nanotubes (Figure 56) qui s'insèrent dans les membranes bactériennes et induisent une fuite du matériel intra-cytoplasmique (79, 80).

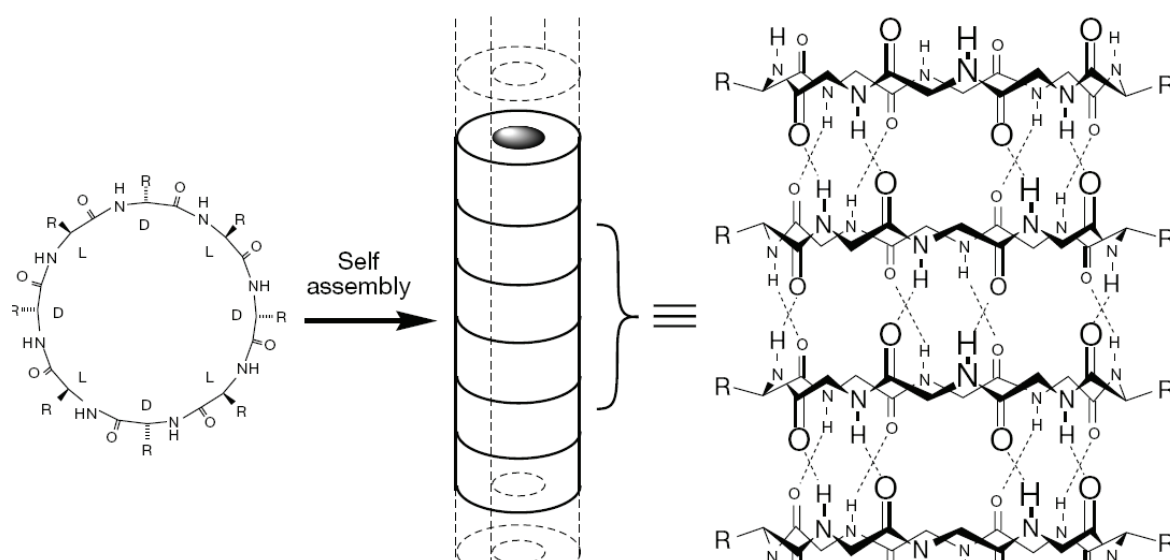


Figure 56 : Séquence d'un pseudopeptide cyclique et autoassemblage en feuillets β pour former un nanotube. (79)

1.1.3 Les pseudopeptides antimicrobiens

La dernière stratégie employée, afin d'augmenter la résistance des peptides aux protéases, est la modification du squelette peptidique et notamment de la liaison peptidique. En plus de cette biodisponibilité accrue, cette approche pseudopeptidique a permis également d'améliorer l'activité et la sélectivité de peptides natifs. Comme les modifications chimiques des chaînes latérales, les modifications de la liaison amide sont très variées, je présenterai rapidement quelques exemples et décrirai plus en détail la classe des aza- β^3 -peptides antimicrobiens qui ont été étudiés lors de cette thèse.

Les pseudopeptides dont les propriétés structurales ont été les plus étudiées sont les β -peptides. Ils possèdent un groupement méthylène additionnel entre deux liaisons peptidiques, la chaîne latérale pourra donc être portée par le carbone C2 ou C3 des acides aminés β , ces peptides sont respectivement nommés β^2 - et β^3 -peptides (Figure 6).

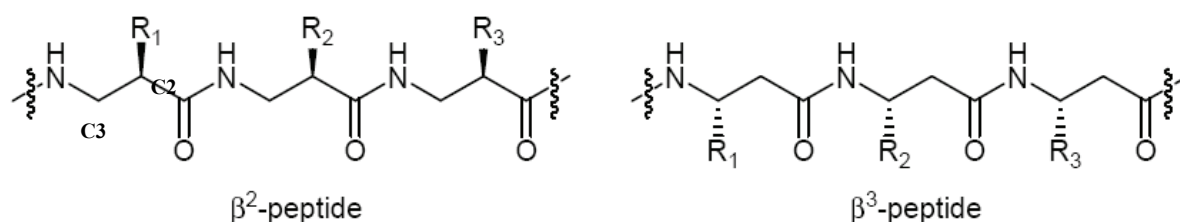


Figure 57: Formules développées de β^2 - et β^3 -peptides.

L'introduction d'un groupement méthylène augmente la flexibilité du squelette peptidique et ces peptides sont capables d'adopter des structures secondaires variées comme différents types d'hélice (hélice 3_{14} et hélice $2,5_{12}$), des feuilletts et des coudes β . Les hélices 3_{14} et $2,5_{12}$ ont respectivement 3 et 2,5 résidus par tour d'hélice et sont stabilisées par un réseau de liaisons hydrogènes (81-84). Ces conformations sont possibles à partir d'une séquence de 10 résidus. Les β -peptides ont une résistance importante aux peptidases et présentent des activités antimicrobiennes très intéressantes (85, 86).

Les peptoïdes (87) ou β -peptoïdes (88, 89) antimicrobiens portent leurs chaînes latérales sur l'atome d'azote (Figure 58). Par conséquent, en absence de protons amides aucune liaison hydrogène sur le squelette peptidique n'est possible et cela défavorise la formation de structures secondaires (87).

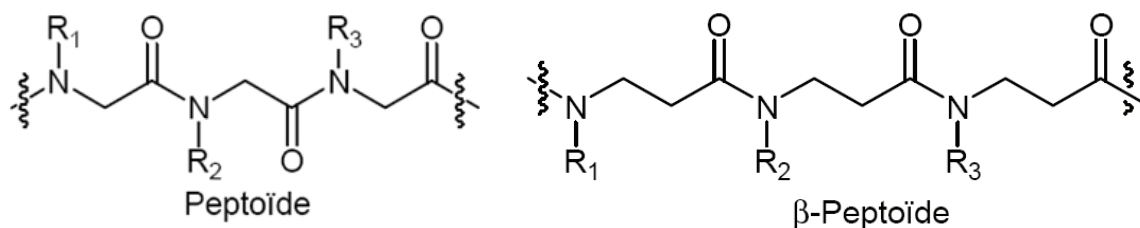


Figure 58 : Formule développées de peptides et de β -peptoides.

Les azapeptides ou azapeptoides résultent d'une substitution du C_α par un atome d'azote. La chaîne latérale est portée par ce N_α dans le cas des azapeptides. Les azapeptides ont la capacité d'inhiber l'activité des protéases nécessaires à la réplication des virus comme la protéase NS3 du virus de l'hépatite C (90, 91). Dans le cas des azapeptoides la chaîne latérale est portée sur l'atome N_β et non N_α comme les azapeptides (Figure 59).

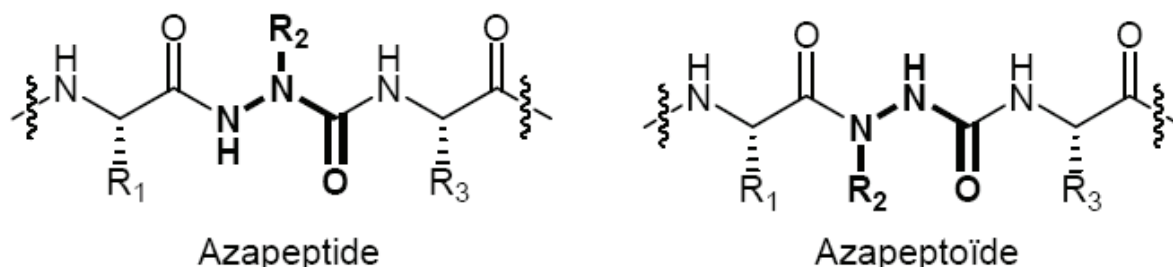


Figure 59 : Formule développées d'azapeptide et d'azapeptide.

Il existe encore beaucoup de types de pseudopeptides comme les oligo-urées (92), (93) qui résultent de l'incorporation d'un NH en α du CO d'une liaison β -peptidique ce qui donne une liaison urée. De même, les liaisons amides sont parfois réduites (94) ou remplacées par des liaisons carbamates (95) pour former des pseudopeptides. Je vais maintenant décrire les aza- β^3 -peptides synthétisés et étudiés dans les laboratoires de M. Baudy-Floc'h et P. Le Grel.

1.1.4 Les aza- β^3 -peptides

Les acides aminés aza- β^3 sont des dérivés aza des acides aminés β^3 (96), ils portent leurs chaînes latérales sur un atome d'azote dont la configuration est variable (Figure 60).

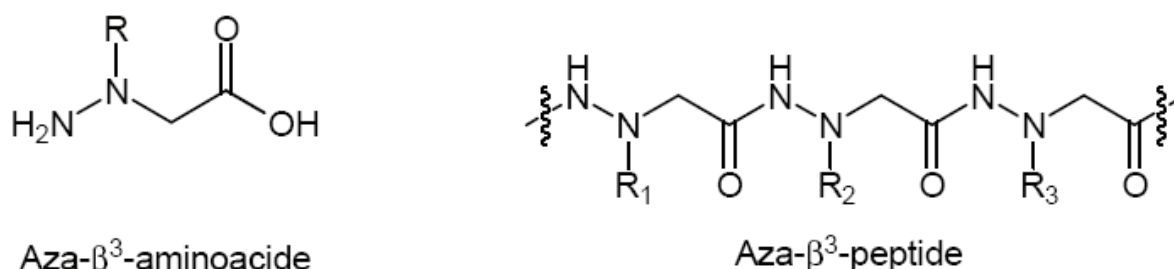


Figure 60: Formules développées des résidus aza- β^3 et des aza β^3 -peptides.

L'azote va pouvoir adopter des configurations R ou S en fonction des interactions ou des contraintes stériques avec une inversion plus ou moins rapide. Chaque résidu aza- β^3 va donc pouvoir mimer un acide aminé D ou L. De plus, comme les β -peptides, les aza- β^3 -peptides sont supposés avoir une certaine flexibilité par l'ajout d'un groupement méthylène dans le squelette peptidique. Des études RMN ^1H en milieu organique et de diffraction des rayons X ont permis de mettre en évidence des réseaux de liaisons hydrogènes entre atomes O_{i-1} et $\text{H}_{\text{Ni}+1}$ et entre le doublet libre du N_i et le $\text{H}_{\text{Ni}+1}$. Ces liaisons hydrogènes sont la cause des déplacements chimiques autour de 9 ppm des protons amides des résidus aza- β^3 . Elles permettent de stabiliser des « N-N turns ou *hydrazinoturns* » (Figure 61) dans les foldamères de peptide aza- β^3 (97).

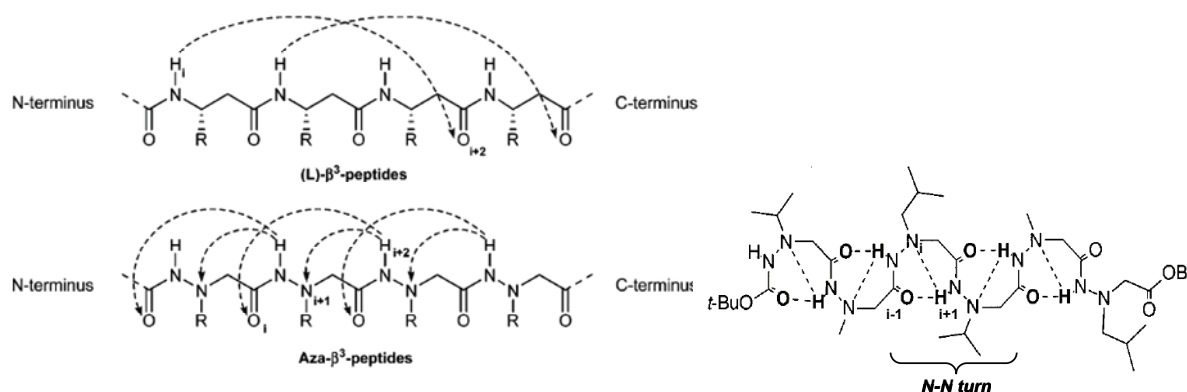


Figure 61: Réseaux de liaisons hydrogènes dans les β^3 -peptides et les aza β^3 -peptides.

On observe ainsi en solution, non pas une structure mais un ensemble de structures en équilibre avec une configuration des résidus aza- β^3 , R ou S.

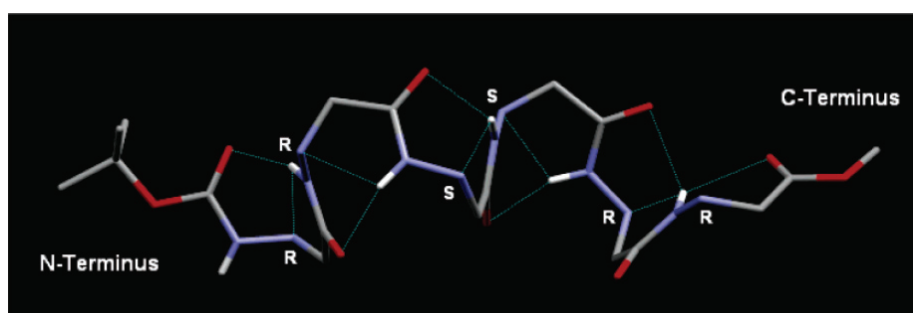


Figure 62: Structure cristallographique d'un aza- β^3 -hexapeptide linéaire (97). Les atomes de carbone sont représentés en gris, d'azote en bleu et d'oxygène en rouge

La formation de N-N turns est également possible au sein de pseudopeptides mixtes composés d'acides aminés α et aza- β^3 , cela va induire des γ -turns au niveau de l'acide aminé α qui précède l'*hydrazinoturn* (Figure 62).

La structure cristallographique d'un hexapeptide cyclique composé uniquement d'acides aminés aza- β^3 montre une alternance R et S de la configuration de l'azote N_α et la présence de deux conformères mettant en évidence la capacité d'inversion de l'azote (Figure 63) (98).

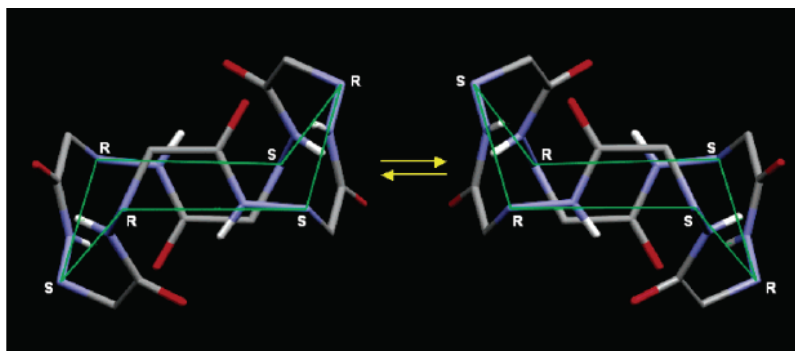


Figure 63 : Structures cristallographiques de deux isomères d'un aza- β^3 -cyclohexapeptide.

Il a été démontré que l'incorporation d'un seul résidu aza- β^3 diminuait la reconnaissance des protéases pour le nouveau pseudopeptide (99). Les propriétés thérapeutiques antitumorales potentielles de ces pseudopeptides ont été précédemment étudiées (99). Les premiers aza- β^3 -peptides présentant des propriétés antimicrobiennes ont été préparés par M. Laurencin durant sa thèse (18).

1.2 Mode d'action des peptides antimicrobiens

Si l'on considère les larges spectres d'activité de la plupart des peptides antimicrobiens et l'absence de variation d'activité *in vitro* lorsque l'on modifie la chiralité des résidus, il est fort probable que la cible des peptides antimicrobiens soit la membrane des microorganismes. Le mécanisme le plus simple est la déstabilisation de la bicouche entraînant l'exclusion des constituants intracellulaires et la mort de la cellule. Néanmoins, certains peptides traversent la membrane cytoplasmique et agissent sur les macromolécules telles l'ADN, les ARN ou encore les protéines, conduisant également à la mort cellulaire comme on le verra ensuite.

1.2.1 La spécificité des peptides antimicrobiens

La différence importante d'activité des peptides antimicrobiens sur les cellules procaryotes et eucaryotes met en avant une spécificité d'action qui semble être principalement liée à la composition lipidique des membranes (100, 101). En effet, la couche externe des lipides des membranes des eucaryotes est riche en phospholipides zwitterioniques (phosphatidylcholine: PC, phosphatidyléthanolamine: PE, sphingomyéline : SM, ...) et ont par conséquent une

charge globale neutre. A l'inverse, les membranes des procaryotes, composées de phospholipides hydroxylés (phosphatidylsérine: PS, phosphatidylglycérol: PG et cardiolipine: CL...), ont une charge globale négative. De même, l'ancrage de lipopolysaccharides (LPS) pour les bactéries Gram négative et d'acide lipotéichoïque qui induit une asymétrie propre aux membranes bactériennes, contribuent à la charge globale négative de la membrane bactérienne (102). Si l'interaction de la plupart des peptides avec les membranes est aspécifique, il est possible d'envisager pour certains, une reconnaissance de type récepteur-ligand avec d'autres composants de la membrane, comme par exemple, les protéines membranaires ou les peptidoglycane (103).

Des modèles de mode d'action des peptides antimicrobiens ont été proposés et de manière générale, on observe trois étapes lors de l'élimination des pathogènes : la fixation initiale, la déstabilisation de la membrane et la mort cellulaire.

1.2.2 De l'interaction à la mort cellulaire

La fixation initiale est guidée tout d'abord par l'attraction électrostatique longue distance. Ensuite, le peptide interagit avec les queues lipophiles des phospholipides de la membrane biologique. Néanmoins, ces fortes interactions hydrophobes aspécifiques sont souvent responsables de la cytotoxicité des peptides antimicrobiens (104). L'interaction avec la membrane est fonction de la concentration peptidique, de la capacité des peptides à adopter une conformation en milieu membranaire, de la composition et de la fluidité membranaire. Des paramètres environnementaux comme la température ou le pH influencent également l'interaction membrane-peptide (105). Ainsi, les peptides interagissent avec la membrane avec des valeurs de constantes cinétique d'association k_{on} et de dissociation k_{off} qui sont très variables (106, 107).

Dans de nombreux cas, les peptides antimicrobiens adoptent une conformation, s'autoassemblent et s'insèrent dans la membrane biologique où ils peuvent former des agrégats ou des pores transmembranaires. Le phénomène de perméabilisation qui en découle peut être transitoire et permettre la pénétration du peptide dans la cellule, ou entraîner directement la mort cellulaire (108, 109).

Par exemple, l'indolicidine bovine et la buforine II ne lysent pas les bactéries avant des concentrations bien supérieures à la CMI. Ces peptides adoptent une conformation, pénètrent dans la cellule bactérienne via la formation de pores transitoires et se fixent sur l'ADN et les

ARN bactériens. Cette complexation entraîne l'inhibition des processus cellulaires et conduit à la mort cellulaire (110, 111).

D'un autre côté, d'autres peptides comme les magainines déstabilisent les membranes des microorganismes et peuvent conduire à la dépolarisation de la membrane, à la perte de métabolites, induire un choc osmotique ou la rupture totale de la membrane plasmique (112). Nous allons voir les différents modes de déstabilisation membranaire proposés dans la littérature.

1.2.3 Les modèles d'interaction peptides membranes

Différents modèles d'interaction des peptides avec les membranes ont été décrits dans la littérature (Figure 64)(108, 113, 114). Je vais décrire les modèles les plus courants : le modèle en tapis (*carpet like model*), les modèles de pores en douves de tonneaux (*barrel-stave model*) et de pores toroïdaux (*wormhole model*), et modèle *detergent-like*.

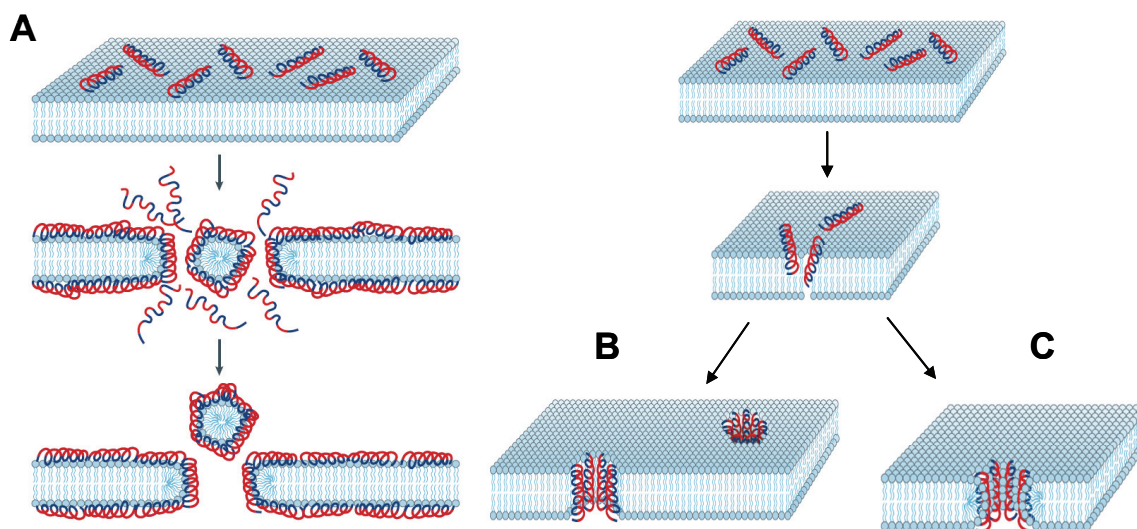


Figure 64 : Représentation schématique de différents modèles: (A) modèle en tapis, (B) en douve de tonneaux et (C) des pores toroïdaux (108). Les résidus hydrophobes sont en bleu et résidus hydrophiles en rouge.

Les peptides qui ont comme mode d'action le modèle en tapis, se déposent parallèlement à la membrane en présentant leurs résidus hydrophobes et ne s'enfouissent que partiellement dans la membrane. A partir d'une certaine concentration en peptides, des amas peptidiques recouvrent la membrane cible comme un tapis et entraînent des désorganisations locales des phospholipides qui vont limiter la fluidité membranaire. Ce désordre entraîne des perforations puis une rupture de la membrane (113, 115, 116).

Dans le cas du modèle de pores en douves de tonneaux, les domaines hydrophobes des peptides s'insèrent plus profondément dans la membrane, repoussant les têtes polaires des phospholipides. A partir d'une certaine concentration peptidique, ils s'orientent perpendiculairement à la bicouche et s'internalisent formant des pores dont la face interne est hydrophile. Les peptides sont disposés comme les planches d'un tonneau (113). Un certain nombre de résidus est nécessaire pour que le peptide puisse traverser la membrane, pour une hélice α , 22 résidus sont nécessaires pour traverser la membrane tandis que 10 résidus en brin β sont suffisants. L'alaméthicine (117, 118) et la pardaxine (119) sont des peptides qui utilisent ce mécanisme d'action pour éliminer les microorganismes. Le modèle des pores toroïdaux est proche du modèle de pores en douves de tonneaux, sauf que dans ce cas les lipides font partie intégrante du pore. En effet, lors du basculement des peptides perpendiculairement à la membrane, les têtes polaires des phospholipides dans cette région se réorientent également contribuant à la stabilisation du pore. Ce modèle est particulièrement adapté à la magainine 2 (120-122) et à la méllitine (123) où les charges négatives des têtes polaires des lipides viennent diminuer la répulsion électrostatique entre peptides cationiques lors de la formation du pore.

Dans le modèle *detergent-like*, les peptides se comportent comme des molécules de détergents. A faibles concentrations, ils forment des micelles qui vont adsorber des molécules de lipides et former des pores transitoires. Pour des concentrations plus importantes, la membrane est complètement déstabilisée via les modèles décrits précédemment (114).

Certains modèles de mécanismes ont été proposés à partir de simulations de dynamique moléculaire pour les peptides très courts qui ne peuvent former des pores ou à l'inverse pour les peptides de grandes tailles (jusqu'à 50 résidus) (124).

Même si un peptide a une propension à adopter un mécanisme plutôt qu'un autre, il est néanmoins possible qu'il utilise plusieurs de ces mécanismes pour conduire à la mort cellulaire.

1.2.4 Les mécanismes de résistance

Bien que les microorganismes rencontrent souvent des peptides antimicrobiens, la diversité de séquence et de structure des peptides, ainsi que leur ciblage aspécifique de la membrane, compliquent la mise au point de stratégies de défense des microorganismes (125). La réponse la plus simple semble être de faire évoluer sa membrane avec des composés moins électronégatifs. Ainsi certaines souches bactériennes sont naturellement résistantes à l'action

des antimicrobiens car elles possèdent des membranes plus complexes riches en phospholipides zwitterioniques ou non chargés. La force attractive électrostatique avec les peptides antimicrobiens dont la plupart sont cationiques est alors beaucoup moins efficace (126, 127). D'autres bactéries secrètent des composés anioniques qui vont piéger les peptides antimicrobiens (128, 129), certaines secrètent des peptidases qui clivent les peptides au niveau des résidus cationiques (lysine et arginine) (130). Des bactéries ou des levures expriment constitutivement des protéines, les *multidrug efflux pumps* qui expulsent les détergents, antibiotiques, peptides du milieu intracellulaire (131). Ces réponses résultent de mécanismes constitutifs, c'est la résistance passive constitutive. Certains organismes ont également des mécanismes de défenses induits en présence de peptides antimicrobiens (132-135).

1.3 Etude structurale par RMN et interactions lipidiques

Nous avons vu précédemment que les peptides antimicrobiens ont tous des modes d'action qui impliquent une interaction avec la membrane plasmique, d'ailleurs la plupart adoptent une conformation uniquement dans des milieux hydrophobes, mimant un environnement membranaire. Par conséquent lors d'une étude structurale, on utilise en général des solvants organiques, des détergents, des liposomes de différentes tailles et de compositions en lipides très variables, et parfois des *sacculi* ou des bactéries. Les peptides, de par leurs petites tailles, sont très flexibles et souvent peu structurés, par conséquent la cristallisation de ces molécules est relativement difficile. La RMN est une technique adéquate pour déterminer leurs structures tridimensionnelles, avec de plus, la possibilité d'utiliser des modèles membranaires en solution (136). Cependant la RMN du liquide nécessite des conditions où le peptide doit rester assez mobile pour enregistrer des spectres résolus. Il est nécessaire de conserver un temps de corrélation suffisamment court pour moyenniser le couplage dipolaire et des temps de relaxation T_2 suffisamment longs pour avoir des signaux assez fins sur les spectres RMN en solution. La nécessité d'étudier la structure des protéines membranaires et les modes d'action des peptides antimicrobiens en milieu membranaire a stimulé le développement de la RMN du solide ces dernières années, je ne développerai pas les avancées en RMN du solide. Plusieurs revues décrivent les développements récents associés à cet aspect de la RMN (137, 138). Je vais décrire maintenant les modèles qui sont traditionnellement utilisés en RMN du liquide : les solvants organiques, les détergents, les bicelles et les liposomes de petits rayons comme les petites vésicules unilamellaires ou SUV (Small Unilamellar Vesicles) (Figure 14).

La manière la plus simple de mimer un environnement membranaire est d'utiliser des concentrations variables de solvants organiques avec une faible polarité comme le trifluoroéthanol (TFE). Cependant l'environnement créé est peu biomimétique et l'étude en solvant organique ne constitue généralement qu'une première étape avant l'utilisation de modèles plus complexes comme les micelles de détergents (139, 140).

Les micelles de détergent anioniques (SDS, Sodium Dodécyl Sulfate) ou zwitterioniques (DPC, DodécylPhosphoCholine) sont couramment utilisées pour déterminer des structures de peptides ou de protéines en solutions (139, 140). Les détergents sont des molécules amphiphiles qui, à partir d'une concentration micellaire critique (cmc) vont s'assembler pour former des micelles. Le peptide, enfoui dans la micelle, est au contact des queues hydrophobes des molécules de SDS ou de DPC. Malgré la simplicité de ce modèle, il s'avère être le plus utilisé pour déterminer des structures tridimensionnelles de peptides en solution ou de petites protéines périphériques (141-143). En effet, que ce soit en solvant organique ou en présence de micelles, les temps de corrélation des peptides sont suffisamment courts pour enregistrer des spectres de bonne qualité.

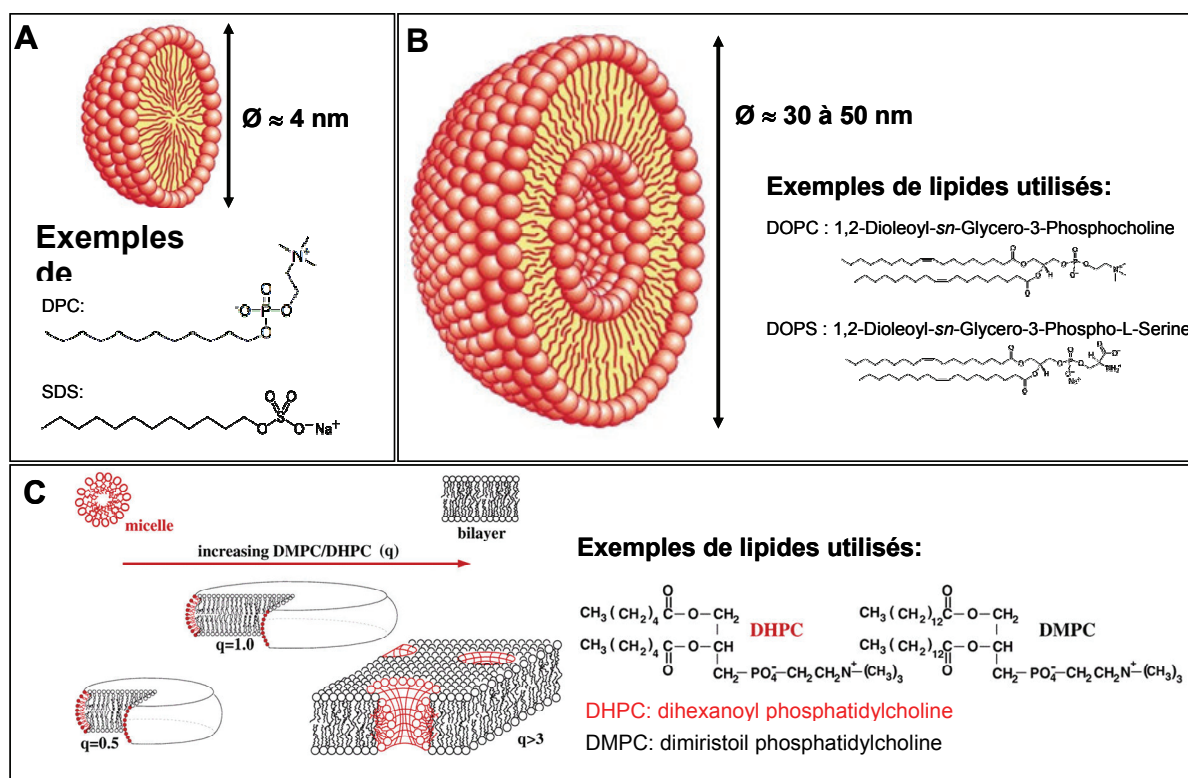


Figure 65 : Schémas de (A) micelles de détergents, (B) de SUV et de (C) bicelles avec des exemples de détergents et de lipides utilisés.

Les modèles suivants sont composés de couches lipidiques de différentes compositions et sont supposés mieux mimer la membrane biologique des microorganismes, je présenterai les bicelles puis les vésicules qui peuvent être multi- ou unilamellaires.

Les bicelles sont un modèle récemment introduit, ce sont des objets discoïdaux à mi-chemin entre les micelles précédemment décrites et les liposomes. Elles sont constituées de phospholipides à chaîne longues (14 à 20 carbones) comme le dimiristoylphosphatidylcholine (DMPC) et à chaînes plus courtes (6 à 8 carbones) comme le dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC) (144). Le rapport des concentrations des lipides à chaînes longues sur les lipides à chaînes courtes s'appelle le rapport q . La valeur de ce rapport influence la forme et la taille des bicelles. S'il est situé entre 0,1 et 1, les bicelles auront des mouvements isotropes compatibles avec une étude en RMN du liquide (145, 146). Il est possible d'ajouter des ions lanthanides (Ln^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} ou Yb^{3+}) ou d'utiliser certains types de lipides de manière à avoir $q > 1$, pour orienter les bicelles le long de l'axe du champ B_0 et d'obtenir ainsi des informations sur la structure des peptides et leurs orientations par rapport à la bicouche (147). Les bicelles sont aussi utilisées en RMN du solide (148). Ce modèle membranaire n'a pas été utilisé lors de nos études.

Les vésicules multilamellaires ou MLV (*multilamellar large vesicles*) constituent un modèle utilisé en RMN HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning) ou en RMN du solide. Ce système peut être utilisé pour d'étudier l'orientation de peptides lors de l'interaction avec les MLV et la RMN ^2H ou ^{31}P permettent d'obtenir des informations sur la structure et la dynamique des phospholipides lors de l'interaction. (149, 150).

Enfin les SUV (*Small Unilamellar Vesicles*) sont des liposomes de petites tailles, de 30 à 50 nm de diamètre qui sont relativement peu utilisés en RMN car les conditions de visibilité des signaux en RMN du liquide ne sont remplies que si la molécule en interaction est suffisamment dynamique (151-153). Des spectres RMN ^1H de bonne qualité ont même été obtenus pour le decapeptide Gly-d-Phe-Ala-Asp en présence de LUV (*Large Unilamellar Vesicles*, diamètre ~150 à 200 nm) (154).

1.4 Mise en contexte et objectifs

L'équipe de J. Henry est spécialisée dans la caractérisation de peptides régulateurs impliqués dans la reproduction de la Sèche, *Sepia officinalis*, et s'intéresse aussi aux propriétés antimicrobiennes associés à ces peptides. Certains de ces peptides ont été isolés et l'activité antimicrobienne évaluée par E. Duval durant son travail de thèse (155). Le groupe

de M. Baudy Floc'h synthétise des acides aminés aza-β3 et optimise les propriétés antimicrobiennes, antivirales et anticancéreuses de peptides naturels. M. Laurencin, lors de sa thèse (17), a significativement augmenté le panel d'acides aminés aza-β3, synthétisé des aza-β3-peptides cycliques et des aza-β3-peptides dérivés des peptides de J. Henry, puis testé leurs activités sur une large gamme de micro-organismes. Il a démontré que l'intégration d'acides aminés aza-β3 pouvait augmenter considérablement l'activité antimicrobienne de certains peptides, mais dans d'autres cas, éteindre l'activité initiale des peptides naturels.

Notre objectif commun est de développer de nouvelles molécules actives en utilisant des acides aminés aza-β3 et de comprendre comment l'incorporation de résidus aza-β3 module les activités des peptides étudiés.

Mon rôle dans cette collaboration a été d'étudier la structure de peptides en présence de modèles membranaires, principalement par dichroïsme circulaire et RMN, afin de proposer un mode d'action et d'étudier l'impact de l'introduction des acides aminés aza-β3 sur la structure de différents peptides.

2. Matériels et méthodes

2.1 Préparation des SUV

Les SUV sont préparées par sonication d'une solution aqueuse de vésicules multilamellaires (MLV) obtenue par réhydratation d'un film lipidique avec de l'eau. Ce film étant lui-même obtenu par évaporation d'une solution de chloroforme contenant 2 équivalents de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) pour un équivalent de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS).

2.2 Diffusion de lumière

La taille des vésicules lipidiques et la capacité des peptides à former des autoassemblages ont été vérifiées par diffusion de lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS) sur un appareil Malvern 4800. Les rayons hydrodynamiques R_h des objets en solution sont déterminés à partir du coefficient de diffusion (D) en utilisant la loi de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad [37]$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température (K) et η est la viscosité (Pa.s) du solvant.

2.3 Mesure des coefficients de diffusion des peptides en présence de SUV

Les expériences de RMN-PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo) ont été utilisées pour mesurer les coefficients de diffusion des peptides en absence et en présence de petites vésicules unilamellaires (SUV). Cette méthode a été décrite dans la partie Matériels et méthodes du premier chapitre.

2.4 Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés avec un spectropolarimètre JASCO J-815 équipé d'un système de contrôle de température Peltier. Les spectres ont été enregistrés à 20°C, dans des cuves de chemin optique de 0,2 cm sur une gamme de longueur d'onde de 190 à 260 nm. Un mode de balayage continu, avec un temps de réponse de 0,5 s, un pas de 0,1 nm, une bande passante de 1 nm et une vitesse de scan de 50 nm.min⁻¹, a été utilisé. Le rapport signal sur bruit a été augmenté en accumulant 2 scans. Chaque spectre a été corrigé en soustrayant le spectre du solvant. Les spectres ont été enregistrés pour des concentrations de 75 à 100 μ M de peptides dans l'eau, en présence de détergents (SDS et DPC) et en présence de SUV de différentes compositions.

2.5 Spectroscopie RMN

Les échantillons RMN contiennent de 0,5 à 2 mM de peptide dissous dans l'eau (90% H₂O, 10% D₂O) à pH 5-6. Les peptides ont été étudiés en présence de micelles de SDS d-25, de DPC d-38, ou de SUV de différentes compositions. Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre RMN Bruker Avance 500 équipé d'une cryosonde 5 mm triple résonance (¹H, ¹³C, ¹⁵N). L'attribution des déplacements chimiques des peptides a été réalisée à l'aide d'une série de spectre 2D homonucléaires et hétéronucléaires : DQF-COSY, TOCSY (MLEV), NOESY, ¹³C-HSQC et ¹³C-HMBC. Ces spectres ont été enregistrés en mode phasé *States-TPPI* ou *echo antiecho* avec une matrice composée de 256-400 (t_1) \times 2048 (t_2) points. Généralement, 64 scans par incrément t_1 avec un délai de relaxation d_1 de 1,5 s et une largeur spectrale de 5341 Hz dans les deux dimensions ont été utilisés. Les temps de mélange sont de 80 à 100 ms pour les expériences TOCSY et 150 à 200 ms pour les expériences NOESY. Les spectres ont été traités avec le logiciel Topspin ou les logiciels NMRPipe/NMRDraw et

visualisé avec Topspin ou NMRView. Les matrices ont subi un *zero-filling* $1024 (t_1) \times 2048 (t_2)$ points après une apodisation par une fonction cosinus carré et une prédiction linéaire en *F1*. Les déplacements chimiques ont été référencés d'après le déplacement chimique de l'eau.

2.6 Modélisation moléculaire

Les déplacements chimiques ^1H ont été attribués d'après la procédure classique d'attribution séquentielle. Les pics croisés NOE ont été attribués et leurs volumes ont été mesurés avec le logiciel NMRView. Les calculs de structure ont été effectués avec le logiciel ARIA 2.0. Les calculs ont débuté en utilisant les paramètres par défaut d'ARIA et un ensemble de pics NOE attribué manuellement. Des contraintes sur les angles de torsion ϕ avec des valeurs $-60 \pm 40^\circ$ ont été appliquées aux résidus dont les protons amides possèdent des constantes de couplage $^3J_{\text{HN-HA}} < 6 \text{ Hz}$. A la fin de chaque calcul ou *run*, les violations de contraintes et les attributions proposées par ARIA ont été vérifiées avant de lancer un nouveau calcul. Cette méthode a été répétée jusqu'à ce que tous les pics NOE soient correctement attribués. Un dernier calcul de 80 structures a été effectué, l'ensemble des 20 structures de plus basses énergies sans violations des contraintes de distance supérieures à 0,3 Å est considéré comme étant représentatives de la structure du peptide. Les représentations et l'analyse quantitative des structures calculées ont été effectuées en utilisant MolMol et PyMOL. Le logiciel PROCHECK a été utilisé pour vérifier la stéréochimie des structures.

3. Peptides étudiés : résultats et discussions

Nous avons étudié trois types de peptides, un peptide antimicrobien *de novo* appelé « K4 », un peptide naturel de seiche et ses dérivés aza- β^3 -peptide et un cyclohexa-aza- β^3 -peptide.

3.1 Etude d'un peptide-surfactant de novo (partie sur article)

Les peptides antimicrobiens sont des molécules actives pouvant se substituer aux antibiotiques dans le cas des microorganismes multi-résistants. Ainsi de nombreux peptides sont synthétisés chimiquement (*de novo*), puis leurs activités antimicrobiennes et leurs cytotoxicités sont mesurées afin de sélectionner les candidats au développement d'agents thérapeutiques. Néanmoins, le coût de production de peptides à grande échelle est bien plus

élevé que celui des antibiotiques conventionnels. Les peptides antimicrobiens ne sont donc encore que peu fréquemment développés par les industries pharmaceutiques.

J. Henry et son équipe ont créé un peptide cationique appelé « K4 » dont la séquence relativement courte (13 acides aminés) est composée majoritairement d'acides aminés hydrophobes. Ce peptide possède une activité intéressante contre de nombreux microorganismes et une cytotoxicité contre les cellules eucaryotes limitée (155). Notre objectif a été de déterminer la structure RMN et de proposer un mode d'action pour ce peptide en combinant différentes techniques (CD et DLS) et en utilisant plusieurs types de modèles membranaires (micelles de détergents et SUV). Les images de microscopie à force atomique ont été enregistrées par J. Sarkis, doctorant également dans l'équipe RMN-ILP, qui travaille avec V. Vié.

Structure and Mechanism of Action of a *de novo* Antimicrobial Peptide

Baptiste Legrand^{1a}, Mathieu Laurencin^{2a}, Emilie Duval³, Murielle Collen¹, Liza Mouret¹, Joe Sarkis^{1,4}, Véronique Vié⁴, Céline Zatylny-Gaudin³, Joël Henry³, Michèle Baudy-Floc'h², Arnaud Bondon^{1*}

ABSTRACT

The K4 peptide was recently demonstrated to display good antimicrobial activities (156). This *de novo* peptide has been constructed to fulfil several criteria: a positively charged moiety and a hydrophobic part linked by a proline residue. The total charge was chosen to +4. In the present study, we used various techniques to look to the structure of the peptide in different media, namely water and solutions of micelles or anionic phospholipidic vesicles. Self-assembly of the peptide in water was demonstrated leading to well defined object around 9 nm. Addition of micelles induces partial peptide folding to an extent which depends on the nature of the micelles: anionic or zwitterionic. The solution structure of the peptide in presence of SDS micelles was solved by NMR displaying a helical character of the entire hydrophobic moiety whereas only partial folding was observed in DPC micelles. Addition of K4 peptide on anionic phospholipids, as small unilamellar vesicles, was shown, by dynamic light scattering, NMR, electronic microscopy and atomic force microscopy to generate larger objects assigned to mixed lipid-peptide micelles. Interestingly, the micrographs obtain by electronic microscopy after addition of peptide on bacteria is also consistent with the formation of mixed lipid peptide vesicles. The strong analogy with the results previously obtained in the study of SDS addition on liposomes was also emphasized. Overall this work strongly supported the detergent like mechanism for the antimicrobial activity of this peptide.

INTRODUCTION

Antimicrobial peptides (AMPs) are essential components of the host innate defense of wide array of organisms and show potential as new therapeutic agents against multi-resistant bacterial pathogens (157-160). Databases report over 1000 sequences for natural AMPs (www.bbcm.univ.trieste.it), while several thousands others have been designed *de novo* and produced synthetically to enhance biological activities and biodisponibility (113). Although they differ widely in sequence AMPs usually consists of 12-50 residues, around 50% of which are hydrophobic, with several cationic residues (to target negatively charged bacterial surfaces) and have the potential to adopt an amphipathic secondary structure when bound to cell membranes. Many AMPs kill bacteria by permeabilization of the cytoplasmic membrane whereas others penetrate into the cell and target additional anionic intracytoplasmic constituents (e.g., DNA, RNA, proteins, or cell wall components) (161). These modes of action require an interaction with the phospholipid bilayer within the cell membrane. The precise nature of AMP-membrane interactions remains controversial and actively debated. Numerous mechanisms have been proposed, including the barrel-stave pore (113), the toroidal pore (162), the carpet (113), the aggregate (163) and the detergent like (164) models. All these models suggest a first step corresponding to the interaction with the phospholipids of the membrane. This process has been shown to imply a high association dissociation dynamic for various peptides (106, 107) inducing conformation changes of the bound peptides and possible self-association.

In a recent work, we described a particularly attractive *de novo* AMP that we called peptide K4 (156, 165). This peptide of 14 amino-acids possesses a cationic polar head composed of four lysines and a lipophilic tail composed of ten hydrophobic residues. This linearly amphiphilic antimicrobial AMP exhibit a broad spectrum of antimicrobial activity on both Gram positive and Gram negative bacteria without haemolytic activity or cytotoxicity on eukaryotic cells at MICs levels. Moreover, we have observed on scanning electron microscopy micrographs, that K4 kills bacteria by disrupting their membrane. We observed the presence of a lot of numerous spherical elements the diameter of which ranged from 0.2 μm to 0.7 μm in the medium. We have proposed that these spheres should be microsomes composed of lipids from bacterial membranes after cell lysis by the K4.

To verify this hypothesis and to understand how this peptide destroys the pathogen agents, we propose to study the K4 using circular dichroism (CD), dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) and NMR in various

media. In water solution, K4 makes self-assembly at high concentration. These nanostructures were observed on SEM micrographs and studied by DLS and NMR. Its critical aggregation concentration (CAC) was determined precisely by the pulsed gradient spin-echo NMR (PGSE-NMR) method. Then, we have used SDS detergent and small unilamellar vesicles (SUVs) to study the K4 behaviour in membrane-mimetic media. We have demonstrated by DLS that in presence of K4, the anionic SUVs self-aggregate until they precipitate at high peptide/lipid ratio. Strikingly, some particles of which the radius is comparable with the microsomes ones observed previously by (SEM) in presence of *E. coli*, appear in the media. The solution structure of K4 was determined in presence of SDS by NMR and we propose a plausible mode of action of the K4 through its particular assembling properties.

We can notice that the structure of the K4 peptide is close to the structures of phospholipids or surfactants known to self-assemble in various nano-objects. Many works have been achieved on designing cationic peptide to build nanostructures (nanovesicles, nanotubes, nanofibers) (166, 167) and self-assembling peptides have demonstrated applications in various fields (tissue engineering, stabilizing membrane proteins, artificial transmembrane channels...) (168). We hypothesise that K4, which forms self-assemblies at high concentration, may act as a surfactant building mixed microsomes composed of peptides and lipids. This destabilization mechanism of the bacterial membrane supports the “detergent like model” previously described (164).

MATERIALS AND METHODS

Samples preparation

The K4 peptide was synthesised as described elsewhere (156). The small unilamellar vesicles (SUV) were prepared by sonication of a multilamellar vesicle (MLV) solution, as previously described (169). The MLV solution was obtained by evaporation of phospholipids in chloroform and then rehydrating the film of lipids thus obtained with water. The neutral SUV contain 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) whereas anionic SUV were prepared using 2 equivalents of DOPC for 1 equivalent of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine] (DOPS) (Avanti Polar Lipids).

Circular Dichroism

CD experiments were carried out using a JASCO J-815 spectropolarimeter (Easton, USA) equipped with a Peltier device for temperature control. The spectra were obtained in water

using a 0.2 mm path length CD cuvette, at 5°C-85°C, over a wavelength range of 190–260 nm. Continuous scanning mode with a response of 0.5 s with 0.1 nm steps, bandwidth of 1nm, and a scan speed of 50 nm per min were used. The signal to noise ratio was improved by acquiring each spectrum over an average of two scans. Finally, each peptide spectrum was corrected by subtracting the background from the sample spectrum. Spectra were recorded at a peptide concentrations of 100 µM in different environments: water, SDS solution, SUV of DOPC and SUV DOPC:DOPS 2:1 solutions.

Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed at 25 °C on a Malvern 4800 PCS equipped with an Ar laser (488 nm) at pH 5. Hydrodynamic diameters (R_h) were calculated from the diffusion coefficient (D) using the Stokes–Einstein equation:

$$R_h = k_B T / (6\pi \eta D),$$

where k_B is the Boltzmann constant, T the absolute temperature and η the viscosity of the solvent.

Scanning electron microscopy

The samples were vacuum dried (Balzers CPD 020) and sputter coated with platinum (Jeol JFC1300) and viewed with a Jeol (JSM 6400 F) scanning electron microscope at the Electron Microscopy Centre of the University of Caen (CMABio). More details!

Atomic force microscopy

To experimentally observe the dynamic assembly behaviour of K4 peptide, AFM was used to follow its structure, on the interface air/water or lipid/water. AFM imaging of Langmuir-Blodgett films (LB films) was performed in contact mode using a Pico-plus atomic force microscope (Agilent Technologies, Phoenix, AZ) under ambient conditions with a scanner of $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Topographic images were acquired in constant force mode using silicon nitride tips on integral cantilevers with a nominal spring constant of 0.06 N/m. Samples for imaging are obtained using the Langmuir-Blodgett technique from Langmuir films.

Peptide on Air/water interface

K4 solution were spread (pressure-area isotherm) on the interface, using a high-precision Hamilton microsyringe. The variation of the surface pressure after stabilization was around 12mN/m. The Langmuir film was transferred on freshly cleaved mica plates at constant surface pressure by raising vertically (2mm/min) the mica through the air/water interface.

Peptide on lipid/water interface

A computer controlled and user programmable Langmuir troughs (Nima Technology, Cambridge, UK) equipped with two movable barriers was used for the surface pressure measurements. Lipid mixture of 1,2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and 1,2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) (1:1 in chloroform/methanol) was gently deposited at the air/water interface of mQ water subphase. After 10 minutes to allow evaporation of the solvent, lipid films were compressed by moving barriers at a rate of 8 cm²/min and equilibrated at the desired surface pressure (30mN/m). After stabilization of the surface pressure of anionic lipid DPPC-DPPG to 30 mN/m, the K4 peptide was injected into the subphase using a microsyringe. The final concentration of the peptide in the trough is 100µg/mL. The surface pressure recording started at the same moment of peptide injection into the subphase. The increase of surface pressure due to adsorption of the peptide to the monolayer was recorded continuously as a function of time. The reproducibility of π values was found to be 0.5 mN/m. After stabilization of the surface pressure (final surface pressure = 35.5 mN/m), the Langmuir film was transferred on freshly cleaved mica plates at constant surface pressure by raising vertically (2mm/min) the mica through the lipid/water interface. Images were obtained from at least three samples prepared on different days with at least three macroscopically separated areas in each sample.

NMR spectroscopy

NMR samples contain typically 1-2 mM K4 dissolved in H₂O/D₂O (90:10) or in micellar solutions containing 50 mM SDS d-25 (Euriso-top) or in small unilamellar vesicles (SUV) PC:PS 2:1 solutions. The pH was adjusted to 5.0 and the temperature varied from 283 to 323K according to the media to improve the signals visibility. All spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance cryoprobe (¹H, ¹³C, ¹⁵N). Homonuclear 2-D spectra DQF-COSY, TOCSY (MLEV) and NOESY were recorded in the phase-sensitive mode using the States-TPPI method as data matrices of 256-400(*t*₁) × 2048 (*t*₂) complex data points; 48 scans per *t*₁ increment with 1.5 s recovery delay and spectral width of 6009 Hz in both dimensions were used. The mixing times were 100 ms for TOCSY; 100, 150 and 200 ms for the NOESY experiments. Spectra were processed with Topspin or the NMRpipe/NMRdraw software package and visualized with Topspin or NMRview on a Linux station. The matrices were zero-filled to 1024 (*t*₁) × 2096 (*t*₂) points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced through the water chemical shift.

PGSE-NMR

The pulsed gradient spin-echo NMR (PGSE-NMR) method was used to measure the self diffusion of the K4 in absence or presence of SDS at different concentrations in D₂O at 293K and 313K. In addition, the translational diffusion coefficients of the SUV in presence of K4 were also determined. NMR signals give rise to exponential decays in the diffusion spectra, and the apparent translational diffusion coefficients were obtained by fitting the following equation to the NMR data:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$$

With I is the measured intensity and I_0 the maximum intensity, D the translational diffusion coefficient, γ the ¹H gyromagnetic ratio, g the gradient strength, δ the pulse field gradient duration and Δ the diffusion delay time .

Structure calculations

¹H chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software. Structure calculations were performed with the ARIA 2.2 software. The calculations were initiated using the default parameters of ARIA and a set of manually assigned NOE. The torsion angle ϕ was restrained to $-60 \pm 40^\circ$ for $^3J_{\text{HN-HA}} < 6$ Hz. At the end of each run, violations and proposed assignment by ARIA were checked before starting a new run. This process was repeated until all the NOE were correctly assigned and no restraints were rejected. A last run of 100 structures was performed, a set of 20 structures of lowest energies with no violation > 0.3 Å were considered as representative of the peptide structure. Representation and quantitative analysis of the calculated structures were performed using MOLMOL and PyMOL softwares.

RESULTS

The K4 peptide has been studied in various media, namely water, in presence of neutral or negative micelles or SUV of different compositions by using various technical approaches. The data are presented for each approach and the discussion will be performed by media with the objective to correlate the data with a possible mechanism of action of this antimicrobial peptide.

CD

CD spectroscopy was used to follow the secondary structure of K4 in different media (Figure 1). The CD spectrum of the peptide dissolved in water is characteristic of a random coil structure. As shown in figure 1A, K4 structure is dependent on the SDS micelle concentration. In presence of 3 mM SDS we can observe a weak negative band at 225 nm and a strong positive band around 201 nm. This shape is characteristic of a β -turn. At higher concentration, 50 mM SDS, K4 exhibits typical α -helical CD spectrum, with minimal mean residue molar ellipticity values at 208 and 222 nm and a maximum near 195 nm. The influence of micelles and SUV of various compositions is displayed on figure 1B. In presence of 50 mM DPC neutral micelles, a weak α -helical character is observed on the spectra. Effect of the SUV addition was also sensitive to the charge of the phospholipids. When adding pure neutral DOPC SUV, the CD spectrum remains characteristic of a random coil conformation as observed in water. In contrast, addition of negative SUV composed of DOPC / DOPS mixture induces strong changes in the CD spectrum with a shape similar to the addition of 3 mM SDS. SUV concentration was raised up to 0.5 mM, which corresponds to the limit before absorption saturation, without observance of a clear transition toward the α -helical character.

DLS

DLS experiment with 10 mM K4 peptide dissolved in water shows two different well defined objects (Figure 2A). A little object with a mean hydrodynamic radius (R_h) of about 1 nm assigned to the free monomeric peptide can be observed whereas another species with a R_h around 9 nm corresponds to the self-assembly of K4 peptide.

DLS experiments were also performed to study the influence of the additions of K4 peptide on SUV in solution (Figure 2). The pure SUV samples (DOPC/DOPS, 2:1, molar ratio; 1mM) correspond to vesicles of homogenous sizes centred on $R_h \approx 70$ nm. Clearly, progressive K4 peptide additions increase the size of anionic phospholipidic vesicles. The size increase occurs immediately after addition of the peptide and remains constant for at least one hour. Interestingly, at a peptide/ lipid molar ratio of 1/50 the system is entirely converted into objects of $R_h \approx 160$ nm. If the peptide/ lipid molar ratio is further enhanced to 1/15, the observed vesicle sizes increase to $R_h \approx 220$ nm. Above, a critical peptide/ lipid molar ratio of 1/9, vesicles are not stable anymore. Ten minutes after addition of the peptide, K4-mediated lipid aggregation is directly observable in the bottom of the DLS cuvette as a white solid appears.

SEM

The micrograph of a water solution of K4 peptide at 10 mM is displayed in Figure 3. A few fibers can be visualised however most of the peptide is present as self assembled structures with a mean diameter of around 10 nm.

AFM

Atomic force microscopy was used to follow the self-organisation of the peptide on the air-water interface, as well as the organisation of K4 under anionic lipid monolayer constituted by DPPC:DPPG (80:20). The data are presented in Figure 4. On the air-water interface (figure 4A) the main information concerns the ruggedness of the AFM image which is consistent with the presence of auto assembled peptide structures. A few fibers can also be observed as previously encountered in the SEM micrograph. Such structures are also found in the AFM images obtained by allowing a K4 peptide solution to dry on mica surface (data not shown). When the peptide was injected under an anionic lipid monolayer, a high adsorption of the peptide to the monolayer was shown by recording continuously the increase of surface pressure as function of time (data not shown). This high adsorption indicates that the peptide has a high affinity for anionic membranes. AFM images show that a progressive destabilization of the lipid monolayer appeared after injecting K4 in the subphase. The higher the concentration of the injected K4 is the more the monolayer is destabilized.

¹H NMR Spectroscopy and structure determination

The K4 concentration dependence in water, from 1 to 20 mM, was investigated by proton 1D NMR (Figure 5). Starting at 4 mM, a severe broadening of all the peptide proton resonances is observed. This broadening is associated with the capacity of K4 peptide to self-assemble at high concentration. When we focus on the amide protons region, we can notice that this trend is more pronounced for the HN of residues localised in the hydrophobic tail. So, only the HN peaks of Lys2, Lys3 and Lys4 are clearly observed for 20 mM K4 at 323K. Further evidence for the self-assembly of K4 was obtained by measuring its diffusion coefficients. The data are presented in Figure 6. The micellar critic concentration was estimated to 7 mM at 30 °C.

1D spectra at 1 mM of K4 were then recorded with increasing SDS concentrations (10, 20, 30, 50 and 200 mM, data not shown). No significant differences in term of chemical shifts or line width can be detected on the spectra with SDS at 50 and 200 mM. Thus the SDS concentration was set to 50 mM for the further experiments which corresponds to an approximately 1.6:1 peptide to micelle ratio assuming 60 SDS molecules by micelle (170).

The quality of the spectra is very good in water and SDS allowing the assignment of nearly all the protons, despite the very close resonances of the methylene protons of the four lysines. The 2D spectra were acquired at 283K in water, at 293K and 323K in SDS detergent. The assignments, at 293K, in the various studied conditions are presented in Table 1-3.

In water, the amide proton $^3J_{\text{HN-HA}}$ coupling constants were all higher than 6 Hz while in presence of SDS micelles, most of the non-glycine residues in the hydrophobic tail, particularly Leu6, Phe7, Leu9, Phe10 and Phe11 residues, exhibit $^3J_{\text{HN-HA}}$ coupling constants lower than 6 Hz. In agreement with the circular dichroism profiles, these results suggest that the K4 does not adopt a characteristic structure in water, but is mainly helical in SDS detergent. Therefore, attempt to solve the solution structure in water and in DPC failed, the calculations with ARIA did not converge. Only ill-defined helix turns in the hydrophobic tail can be distinguish in presence of DPC micelles. The Pro5 appears to be in the *trans* conformation based on NOE patterns, since strong cross peaks between its H_δ and the H_α and the H_β of the Lys4 could be observed, as well as very weak NOE between the proline H_α and the preceding H_α and the H_β protons.

In the ARIA final run, the K4 peptide structures in presence of SDS, were calculated using 213 distance restraints and 5 dihedrals restraints (see table 4). The 20 lowest energy conformers, refined in a shell of water, are represented figure x. The global fold of the K4 peptide displays a well-ordered helical hydrophobic C-terminal moiety (5-14) and a disordered N-terminal region which contains the four lysines. The two parts are separated by the Pro5 which bend the peptide. Indeed, the backbone RMSD on the whole structure is 2.40 Å and falls to 0.86 Å if the poorly defined N-terminal moiety is ignored. The backbone and heavy atoms RMSD on different regions of the peptides are shown in table 4. Unsuccessfully, NOESY experiments using a mixture of unlabeled SDS and SDS d-25 (1:4), were acquired to attempt to detect intermolecular NOE between the K4 and SDS.

^{31}P NMR Spectroscopy

The ^{31}P spectra of the phospholipids have been recorded while addition of peptide was performed. As shown in Figure 8, a severe broadening of the resonances is observed in good agreement with a gradual increase of the vesicle-micelle size induced by the addition of the peptide.

Discussion

Antimicrobial peptides constitute an interesting domain in order to prepare new antibiotics molecules. Major improvement in the knowledge of the responsible parameters of the antimicrobial activity permits to design *de novo* active peptides. (171) The peptide analysed in this study has been constructed following several general rules. The overall charge is cationic (+4), the C-terminal sequence is hydrophobic and comprises three leucines and four phenylalanines, a flexible hinge connecting the charged and the hydrophobic segments is insured by a proline residue. This design was shown to be very efficient against several bacterial strains. (156) However, the mechanism of action of a peptide cannot be predicted by a direct analysis of its peptide sequence. This observation stimulates to perform various studies to obtain a better understanding of the mode of action.

Structural studies and self assembly

The K4 peptide was studied in solution by CD, DLS and NMR. In water, at low concentration, no defined structure was observed as evidenced by CD and proton NMR studies. Increase of K4 concentration corresponds to a severe broadening of all the peptide proton resonances. This broadening has been associated with micellar behaviour of the peptide; such interpretation was further reinforced through the self coefficient diffusion measurement by pulse field gradient experiment. A cmc of 7 mM was determinate at 30°C. Finally, self assembly capacity of K4 was observed by DLS. At 10 mM, in addition of a small object around 1 nm assigned to the monomeric form of the peptide, self assembled specie was observed around 9 nm. Such a behavior of small peptide has already been encountered (166, 172-175). These objects could correspond to K4 micelles or to vesicles in agreement with DLS, SEM AFM and NMR.

Structural studies in micelles

Due to the severe broadening of K4 protons in the self assembly state, we performed the structural study of K4 in a hydrophobic environment. SDS micelles are well suitable for NMR studies because of the small size of the micelles and their high dynamic behaviour.

Interaction with phospholipids

Addition of the K4 peptide on SUV of negatively charged phospholipids induces progressive and large increase of the size of the vesicles as highlight by DLS and ³¹P NMR. Strong association is also consistent with the AFM data demonstrating the destabilisation of the

phospholipid monolayer. Concerning the mechanism of action, it cannot be excluded that favourable electrostatic interactions with anionic phospholipids could induce local increase peptide concentration and subsequent peptide micelle formation. However, such a process is not necessary to account for the bilayer destruction. It has been demonstrated with SDS micelles that lipid-detergent association occurs with the detergent in a monomer form. This mode of action of detergent is observed even when detergent concentration is over the cmc (176, 177). This suggests that SDS monomer dissociation from the micelle is fast and that micelle formation is not a prerequisite for the formation of mixed lipid-detergent microsomes. In the present case, the K4 peptide is active on bacteria below its cmc and interaction with the membrane should occur in the monomeric state. Further evidence for a mechanism of action closely related to the SDS one is given by the comparison of the scanning electron micrographs of *E. coli* treated with K4 and the addition of SDS on microsomes (figure 9). In both cases apparent mixed lipid-peptide and lipid-detergent were formed. The difference in the size of the observed mixed microsomes can be related with the size of the precursors. K4 was added on full size bacteria which induced microsomes in the range 200-700 nm (156) whereas SDS was added on liposomes of roughly 100-200 nm (26).

Conclusion

Acknowledgements

References

1. Duval, E., C. Zatylny, M. Laurencin, M. Baudy-Floc'h, and J. Henry. 2009. KKKKPLFGLFFGLF: a cationic peptide designed to exert antibacterial activity. *Peptides* 30:1608-1612.
2. Andreu, D., and L. Rivas. 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47:415-433.
3. Epand, R. M., and H. J. Vogel. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:11-28.
4. Hancock, R. E., and D. S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1317-1323.
5. Zasloff, M. 2002. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet* 360:1116-1117.
6. Shai, Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66:236-248.
7. Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3:238-250.
8. Matsuzaki, K., Y. Mitani, K. Y. Akada, O. Murase, S. Yoneyama, M. Zasloff, and K. Miyajima. 1998. Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. *Biochemistry* 37:15144-15153.
9. Wu, M., E. Maier, R. Benz, and R. E. Hancock. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38:7235-7242.
10. Bechinger, B., and K. Lohner. 2006. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758:1529-1539.
11. Almeida, P. F., and A. Pokorny. 2009. Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics. *Biochemistry* 48:8083-8093.
12. Lee, M. T., W. C. Hung, F. Y. Chen, and H. W. Huang. 2008. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105:5087-5092.
13. Baudy, F. H. M., G. C. Zatylnyj, J. Henry, E. Duval, and M. Laurencin. 2009. Antimicrobial pseudopeptides, drug and pharmaceutical composition containing them. (Serb, Fr.; Centre National de la Recherche Scientifique Cnrs; Universite de Caen Basse Normandie). Application: FR

14. von Maltzahn, G., S. Vauthey, S. Santoso, and S. Zhang. 2003. Positively Charged Surfactant-like Peptides Self-assemble into Nanostructures. *Langmuir* 19:4332-4337.
15. Xu, H., J. Wang, S. Han, J. Wang, D. Yu, H. Zhang, D. Xia, X. Zhao, T. A. Waigh, and J. R. Lu. 2009. Hydrophobic-Region-Induced Transitions in Self-Assembled Peptide Nanostructures. *Langmuir* 25:4115-4123.
16. Ulijn, R. V., and A. M. Smith. 2008. Designing peptide based nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 37:664-675.
17. Da Costa, G., S. Chevance, E. Le Rumeur, and A. Bondon. 2006. Proton NMR detection of porphyrins and cytochrome c in small unilamellar vesicles: role of the dissociation kinetic constant. *Biophys. J.* 90:L55-L57.
18. Balayssac, S., F. Burlina, O. Convert, G. Bolbach, G. Chassaing, and O. Lequin. 2006. Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency. *Biochemistry* 45:1408-1420.
19. Dathe, M., H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, and M. Bienert. 2001. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 501:146-150.
20. Tsonchev, S., K. L. Niece, G. C. Schatz, M. A. Ratner, and S. I. Stupp. 2008. Phase diagram for assembly of biologically-active peptide amphiphiles. *J Phys Chem B* 112:441-447.
21. Vauthey, S., S. Santoso, H. Gong, N. Watson, and S. Zhang. 2002. Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:5355-5360.
22. van Hell, A. J., C. I. Costa, F. M. Flesch, M. Sutter, W. Jiskoot, D. J. Crommelin, W. E. Hennink, and E. Mastrobattista. 2007. Self-assembly of recombinant amphiphilic oligopeptides into vesicles. *Biomacromolecules* 8:2753-2761.
23. Yan, X., Y. Cui, Q. He, K. Wang, J. Li, W. Mu, B. Wang, and Z. C. Ou-Yang. 2008. Reversible transitions between peptide nanotubes and vesicle-like structures including theoretical modeling studies. *Chemistry* 14:5974-5980.
24. Cocera, M., O. Lopez, J. Estelrich, J. L. Parra, and A. de la Maza. 2000. Kinetic and Structural Aspects of the Adsorption of Sodium Dodecyl Sulfate on Phosphatidylcholine Liposomes. *Langmuir* 16:4068-4071.

25. Cocera, M., O. Lopez, J. Estelrich, J. L. Parra, and A. de la Maza. 2001. Use of a fluorescence spectroscopy technique to study the adsorption of sodium dodecylsulfonate on liposomes. *Chem Phys Lipids* 109:29-36.
26. de la Maza, A., and J. L. Parra. 1995. Vesicle-micelle structural transitions of phospholipid bilayers and sodium dodecyl sulfate. *Langmuir* 11:2435-2441.

Tables

| AA | HN | H α | H β | Others |
|-----|------|------------|------------|---|
| K1 | no | 3.73 | 1.17 | γ CH2 1.41; δ CH2 1.62; ϵ CH2 2.72; ζ NH2 no |
| K2 | 8.54 | 4.04 | 1.47 | γ CH2 1.17; δ CH2 1.40; ϵ CH2 2.69; ζ NH2 no |
| K3 | 8.37 | 4.00 | 1.37 | γ CH2 1.37; δ CH2 1.44; ϵ CH2 2.68; ζ NH2 no |
| K4 | 8.25 | 4.22 | 1.41 | γ CH2 1.15; δ CH2 1.49; ϵ CH2 2.68; ζ NH2 no |
| P5 | - | 4.05 | 1.88, 1.48 | γ CH2 1.25; δ CH2 3.52, 3.28; ϵ CH2 |
| L6 | 8.08 | 3.95 | 1.25, 1.13 | γ CH 1.25; δ CH3 0.59, 0.55 |
| F7 | 7.87 | 4.34 | 2.85, 2.73 | δ CH 6.94; ϵ CH 7.05; ζ CH nd |
| G8 | 8.08 | 3.61, 3.45 | | |
| L9 | 7.79 | 3.94 | 1.17, 1.04 | γ CH 1.17; δ CH3 0.59, 0.52 |
| F10 | 7.97 | 4.29 | 2.76, 2.63 | δ CH 6.86; ϵ CH 7.01; ζ CH nd |
| F11 | 8.00 | 4.24 | 2.84, 2.66 | δ CH 6.95; ϵ CH 6.95; ζ CH 6.95 |
| G12 | 7.63 | 3.55, 3.44 | | |
| L13 | 7.74 | 4.04 | 1.24, 1.18 | γ CH 1.18; δ CH3 0.61, 0.54 |
| F14 | 7.49 | 4.15 | 2.88, 2.65 | δ CH nd; ϵ CH nd; ζ CH nd |

Table 1: K4 peptide in H₂O:D₂O (90:10) at 283K and pH 5.

| AA | HN | H α | H β | Others |
|-----|-------|--------------|--------------|--|
| K1 | no | 3.98 | 1.800 | γ CH2 1.320; δ CH2 1.600; ϵ CH2 2.895; ζ NH2 no |
| K2 | 8.414 | 4.204 | 1.681 | γ CH2 1.355; δ CH2 1.565; ϵ CH2 2.855; ζ NH2 no |
| K3 | 8.060 | 4.160 | 1.658 | γ CH2 1.309; δ CH2 1.549; ϵ CH2 2.855; ζ NH2 no |
| K4 | 7.950 | 4.500 | 1.740, 1.600 | γ CH2 1.355; δ CH2 1.565; ϵ CH2 2.855; ζ NH2 no |
| P5 | - | 4.254 | 2.132 | γ CH2 1.840, 1.658; δ CH2 3.587 |
| L6 | 8.010 | 4.020 | 1.584, 1.300 | γ CH 1.435; δ CH3 0.758, 0.680 |
| F7 | 7.730 | 4.220 | 3.060 | δ CH 7.145 ; ϵ CH 7.080; ζ CH nd |
| G8 | 8.130 | 3.790, 3.710 | | |
| L9 | 7.660 | 3.990 | 1.557, 1.250 | γ CH 1.420 ; δ CH3 0.736, 0.650 |
| F10 | 7.747 | 4.170 | 2.840 | δ CH 6.810; ϵ CH 6.980; ζ CH nd |
| F11 | 7.940 | 4.260 | 2.850, 3.070 | δ CH 7.187, 7.090; ϵ CH ; ζ CH |
| G12 | 7.790 | 3.840, 3.740 | | |
| L13 | 7.496 | 3.965 | 1.300, 0.965 | γ CH 1.480; δ CH3 0.683, 0.612 |
| F14 | 7.226 | 4.287 | 2.655, 3.038 | δ CH 7.050; ϵ CH 6.910; ζ CH nd |

Table 2: K4 peptide with 50mM SDS, (H₂O:D₂O 90:10) at 293K and pH 5.

| AA | HN | H α | H β | Others |
|-----|-------|--------------|--------------|--|
| K1 | no | 3.953 | 1.842 | γ CH2 1.394; δ CH2 1.648; ϵ CH2 2.946; ζ NH2 no |
| K2 | no | 4.285 | 1.725 | γ CH2 1.392; δ CH2 1.602; ϵ CH2 2.909; ζ NH2 no |
| K3 | 8.482 | 4.239 | 1.717 | γ CH2 1.388; δ CH2 1.648; ϵ CH2 2.946; ζ NH2 no |
| K4 | 8.393 | 4.514 | 1.613 | γ CH2 1.415; δ CH2 1.732; ϵ CH2 2.886; ζ NH2 no |
| P5 | - | 4.360 | 2.146, 1.741 | γ CH2 1.925; δ CH2 3.583, 3.749; ϵ CH2 |
| L6 | 8.708 | 4.015 | 1.436, 1.615 | γ CH 1.436; δ CH3 0.834, 0.779 |
| F7 | 8.409 | 4.361 | 3.115, 3.187 | δ CH 7.208; ϵ CH 7.208; ζ CH 7.208 |
| G8 | 8.188 | 3.861, 3.698 | | |
| L9 | 7.870 | 4.092 | 1.277, 1.522 | γ CH 1.578; δ CH3 0.810, 0.757 |
| F10 | 7.871 | 4.317 | 3.045, 2.876 | δ CH 7.027; ϵ CH 7.027; ζ CH 7.027 |
| F11 | 7.996 | 4.316 | 2.972, 3.174 | δ CH 7.208; ϵ CH 7.208; ζ CH 7.208 |
| G12 | 8.077 | 3.870 | | |
| L13 | 7.697 | 4.068 | 1.561, 1.441 | γ CH 1.171; δ CH3 0.801, 0.748 |
| F14 | 7.308 | 4.353 | 3.161, 2.813 | δ CH 7.170; ϵ CH 7.170; ζ CH 7.170 |

Table 3: K4 peptide with 50mM DPC, (H₂O:D₂O 90:10) at 293K and pH 5.

| | | |
|---|----------|-----------------|
| <u>Conformationnal restraints</u> | | |
| Total: | 213 | |
| Non ambiguous: | 104 | |
| Ambiguous: | 109 | |
| Dihedrals restraints ($^3J_{\text{HNHA}}$) | 5 | |
| <u>Restraints violations</u> | | |
| Distance restraints $> 0,3 \text{ \AA}$ | 0 | |
| Dihedrals angle restraints $> 5^\circ$ | 0 | |
| <u>Energetics statistics (kcal.mol⁻¹)</u> | | |
| E _{tot} | -322.90 | |
| E _{vdw} | -108.20 | |
| E _{elec} | -358.18 | |
| E _{noe} | 34.26 | |
| <u>Ramachandran maps*</u> | | |
| Residues in most favoured regions | 82.2% | |
| Residues in additional allowed regions | 16.1% | |
| Residues in generously allowed regions | 1.7% | |
| Residues in disallowed regions | 0% | |
| <u>Average RMSD (pairwise, \AA)</u> | | |
| Whole (1-14) | Backbone | All heavy atoms |
| | 1.23 | 2.28 |
| Helix (5-14) | 0.52 | 1.00 |

* Ramachandran plots calculated using Procheck.

Table 4: Structural statistics for the 20 models of K4 bound to SDS micelles.

Figure Legends

Figure 1: K4 peptide CD spectra in various media. In water (in black), with 3 mM and 50 mM SDS (respectively in light green and green), 50 mM DPC (in purple), neutral SUVs (in blue) and anionic SUVs (in red).

Figure 2: (A) Hydrodynamic radius of K4 self-assembly and (B-D) size distribution of anionic (DOPC:DOPS, 2:1) SUV (10 mM) in presence of K4 for various peptide/lipid ratio. (B) 10 mM SUV alone, peptide:SUV ratio of (C) 2/98, (D) 4/96 and (E) 6/94.

Figure 3 : (A) Scanning electron micrograph of 10 mM K4 in solution.

Figure 4: AFM topographic images of K4 at the (A) Air/liquid and (C-D) lipid/liquid interface. (A) K4 peptide (100 µg/ml) on mica (B) DPPC:DPPG (2:1) lipid monolayer at 30mN/m. (C-D) Lipid monolayer at 30mN/m with increasing K4 concentrations. (C) 100µg/ml and (D) 200µg/mL K4. For all images, scan size is $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, height scale is 10 nm.

Figure 5: Amide proton region of ^1H NMR spectra at 323K, pH 5.0 ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) of K4 at various concentrations. (A) 20 mM (B) 12 mM (C) 10 mM (D) 8 mM (E) 6 mM (F) 4 mM (G) 2 mM.

Figure 6: Apparent diffusion translational coefficient (D) of the K4 peptide vs its concentration at 303 K (grey triangle) and 323 K (black diamond).

Figure 7: Structures of the K4 in SDS micelles (A) The 20 lowest energy structures of K4 from the x structures calculated in the final iteration of ARIA. The superposition was performed using the backbone atoms of residues 5-13. (B) Ribbon representation and sizes of the best structure of the K4. The side chains are represented as stick (lysine in blue, proline in yellow, phenylalanine in red and leucine in green).

Figure 8: ^{31}P NMR spectra of DOPC:DOPS (2:1) SUV depending on the concentration of added K4 peptide. 20mM SUV alone (dotted line) and with a peptide/lipid ratio of 1:40

(dashed line), 1:20 (continuous line). With a 1:10 ratio, no phosphorus peaks could be detected due to severe broadening.

Figure 9: Scanning electron micrographs of *E. coli* treated with K4. *E. coli* in mid-logarithmic growth was incubated with antibacterial peptide K4 for 2 h. Left: K4 was added at 100 µg/ml, the insert corresponds to untreated bacteria (adapted from (156)). Right: Phosphocholine liposomes with SDS detergent adapted from (178).

Figure 1

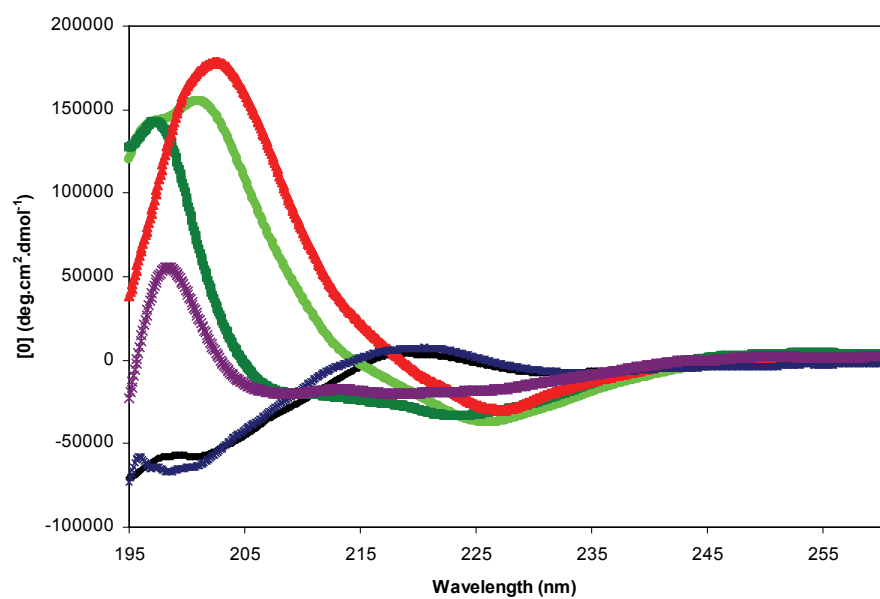


Figure 2

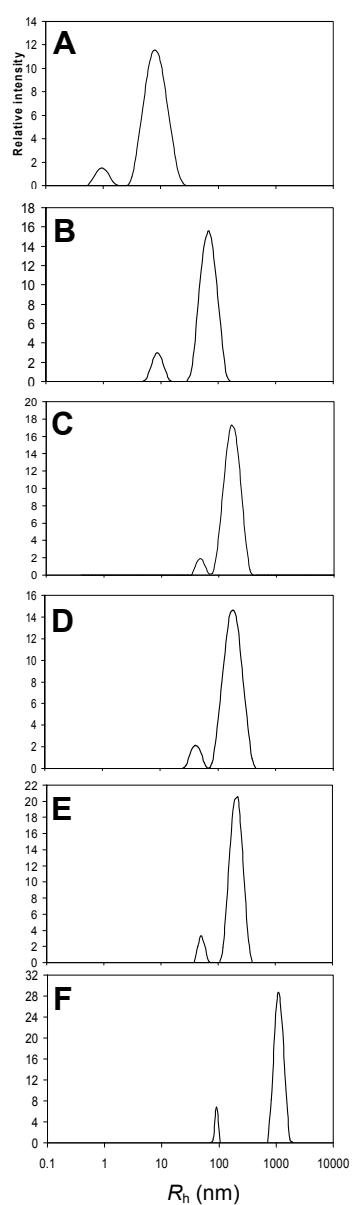


Figure 3

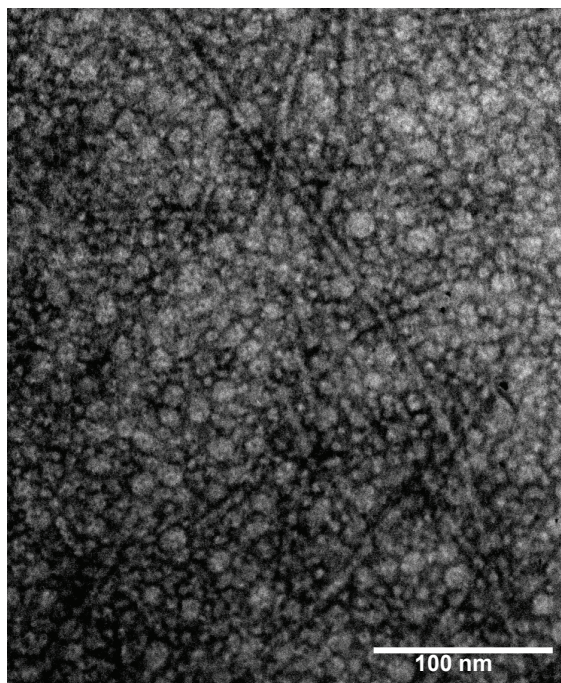


Figure 4

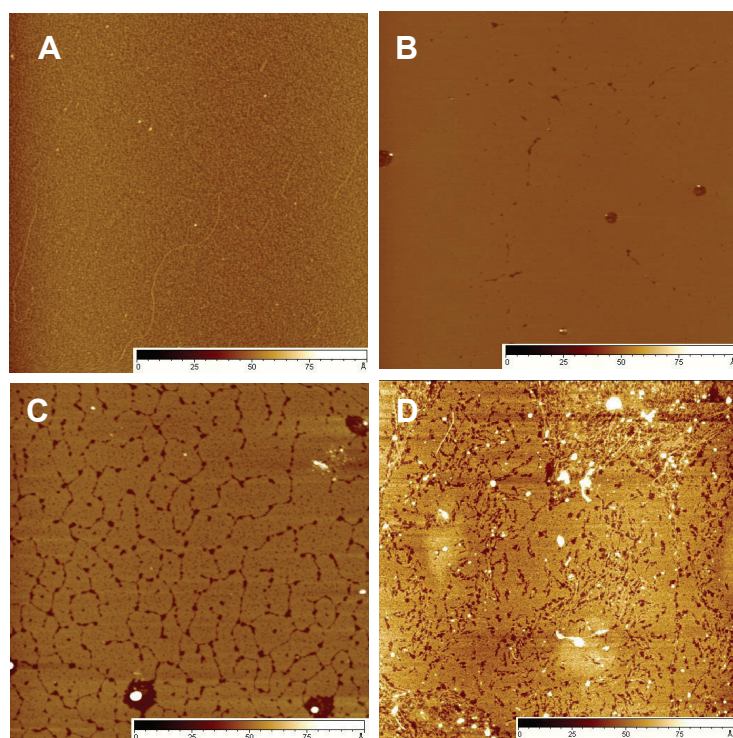


Figure 5

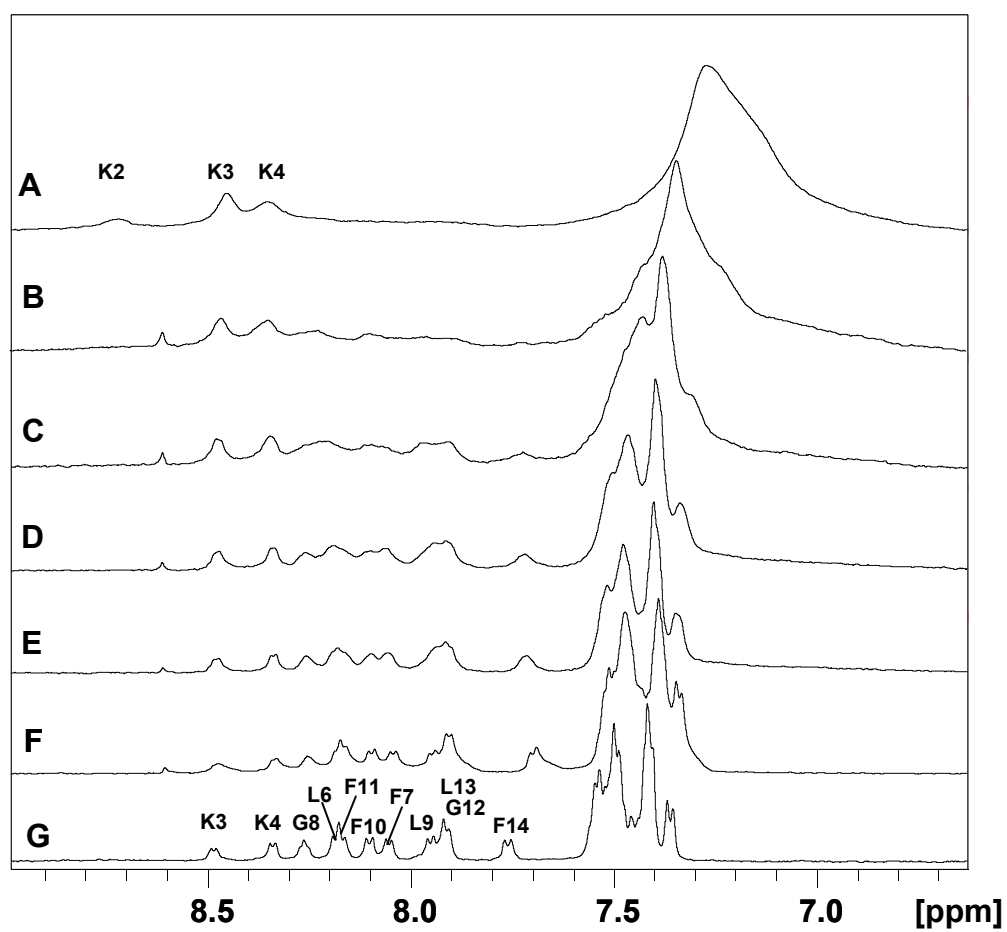


Figure 6

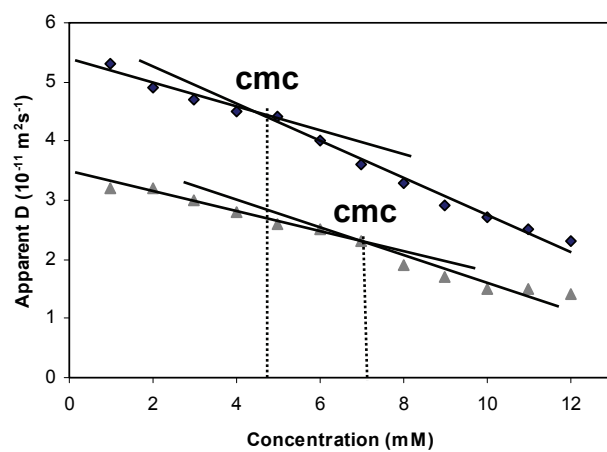


Figure 7

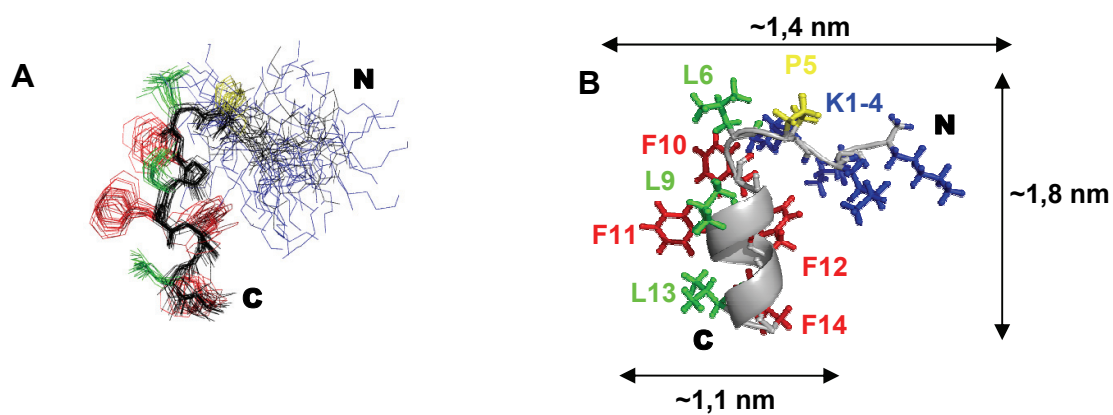


Figure 8

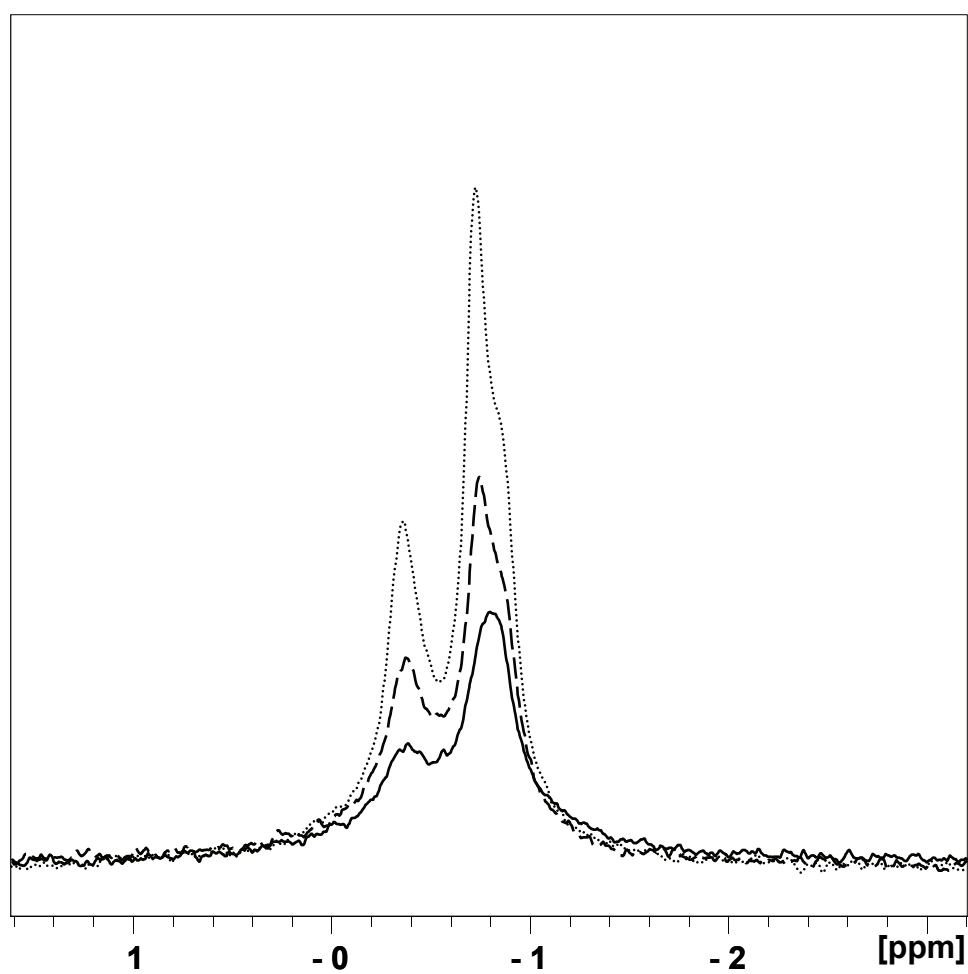
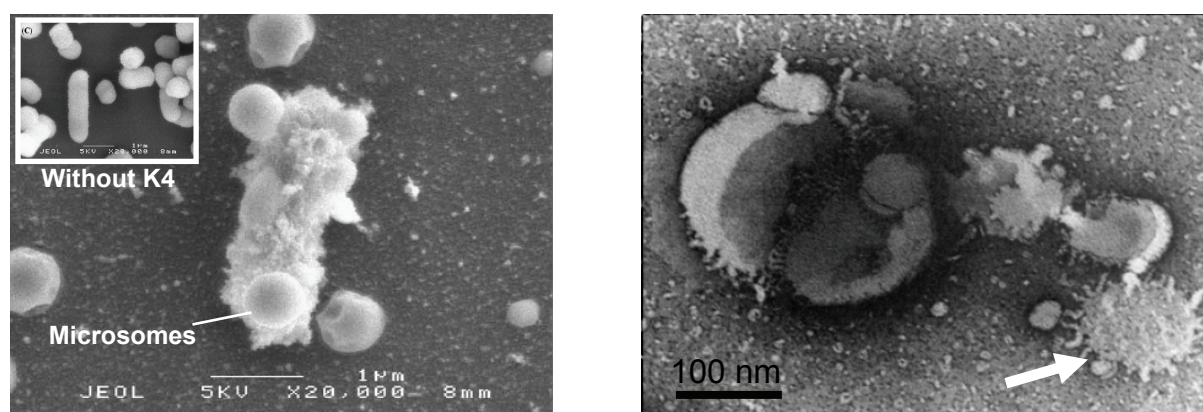


Figure 9



3.2 Relation activité-structure de peptides antimicrobiens d'origine marine (partie sur article)

Les océans sont très riches en microorganismes, les concentrations bactériennes et virales, dans le milieu marin, sont de l'ordre de 10^3 à 10^6 bactéries/mL et de 10^9 virus/mL d'eau. Par conséquent, les invertébrés marins ont développé des défenses contre ces pathogènes reposant essentiellement sur les mécanismes de l'immunité innée dont les principaux acteurs sont les peptides antimicrobiens. Ainsi, même certains peptides dont la fonction principale n'est pas la défense contre les pathogènes comme des neuropeptides ou des hormones possèdent des activités antimicrobiennes.

Dans ce contexte, J. Henry et son équipe, ont réalisé des mesures d'activités antimicrobiennes des neuropeptides de la seiche, *Sepia officinalis*, préalablement identifiés. Ils ont mis en évidence l'activité antimicrobienne d'un neuropeptide, appartenant à la famille des FaRP (*FMRamide related peptides*), impliqué dans la régulation de la reproduction de la seiche. Tandis que de nombreuses cibles des FaRP ont été identifiées, c'est la première fois qu'une activité antimicrobienne est mise en évidence pour un neuropeptide de cette famille.

Ce peptide, nommé AD, ainsi que des pseudopeptides dérivant de sa séquence ont alors été synthétisés et des tests d'activité ont ensuite été effectués sur une batterie de microorganismes par l'équipe de M. Baudy Floc'h. La structure de ces peptides et pseudopeptides ont été déterminées par RMN, en présence de micelles de SDS, pour étudier le lien structure-activité de ces peptides. Ce sont les premières structures de peptides antimicrobiens possédant des résidus aza- β^3 .

La modélisation d'aza- β^3 -peptide a nécessité de définir et les paramètres des résidus incorporés dans les séquences et la modification de nombreux fichiers CNS et ARIA. La modélisation de peptides modifiés avec ARIA/CNS et les parties modifiées sont présentées dans l'annexe 3.

From a Natural Occurring RFamide Neuropeptide to Antimicrobial Pseudopeptides including Aza- β^3 - AminoAcids: The essential role of the Structuration.

*Mathieu Laurencin[†], Baptiste Legrand[‡], Emilie Duval[§], Céline Zatylny-Gaudin[§], Joël Henry[§],
Arnaud Bondon[‡], Michèle Baudy-Floc'h^{†*}*

[†] ICMV, UMR CNRS 6226 Université de Rennes 1, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042
Rennes Cedex, France, [§] UMR 100 IFREMER PE2M, Université de Caen Basse Normandie,
14032, Caen Cedex, France, and [‡] RMN-ILP, UMR CNRS 6026, Université de Rennes 1, CS 34317,
Campus de Villejean, 35043 Rennes cedex, France.

Corresponding author. michele.baudy-floch@univ-rennes1.fr

RECEIVED DATE

TITLE RUNNING HEAD

CORRESPONDING AUTHOR FOOTNOTE

Corresponding author. Tel./fax: +33 223236933

ABSTRACT

Nosocomial infections caused by antibiotic resistant bacteria constitute a global health problem. Since more than twenty years, the evolutionarily conserved antimicrobial peptides (AMPs) of the innate immune response are extensively studied and represent candidates as alternative drug to treat these infections. Nevertheless, the development of AMPs in pharmaceutics is limited by their short *in vivo* biodisponibilities and their low selectivities. In this context, we report here the first antimicrobial activity of a mollusk endogenous neuropeptide. Like numerous AMPs and neuropeptides, this peptide partially adopts an amphiphilic α -helical conformation in a hydrophobic environment. To improve its antimicrobial properties, we incorporated aza- α^3 -aminoacids known to lead to pseudopeptides with better biodisponibilities, activities and interactions. We show that, depending on the nature of the substitution, these could result either in inactive pseudopeptides or in a drastic enhancement of the antimicrobial activity without high cytotoxicity. The structural study of pseudopeptides performed by NMR and circular dichroism permits to underline the role of aza- α^3 -aminoacids in the structuration of an AMP. We obtain the first three-dimensional structures of naturally related linear pseudopeptides containing aza- α^3 -aminoacids in aqueous micellar SDS. These results provide relevant informations and demonstrate the possible improvement of AMPs through the incorporation of these aminoacid analogs.

KEYWORDS (Word Style “BG_Keywords”). If you are submitting your paper to a journal that requires keywords, provide significant keywords to aid the reader in literature retrieval.

BRIEFS (WORD Style “BH_Briefs”). If you are submitting your paper to a journal that requires a brief, provide a one-sentence synopsis for inclusion in the Table of Contents.

Introduction

Resistance of pathogens against conventional antibiotics is increasing at a rate that far exceeds the pace of new development of drugs. In this context antimicrobial peptides (AMPs) and their analogues are potentially new therapeutic agents against multi-resistant microorganisms. AMPs are natural occurring peptides that play essential roles in the host innate defense of wide array of organisms and represent one of the major anti-infectious agents against bacterial pathogens.¹⁻⁶ At this time, databases report over 1000 sequences for natural AMPs (www.bbcm.univ.trieste.it), whereas several thousands others have been designed *de novo* and produced synthetically.⁷ Although they differ widely in sequence, AMPs are usually short (12-50 residues) with hydrophobic and cationic residues, spatially segregated in amphipathic structures. Many AMPs kill microorganisms by permeabilization of the cytoplasmic membrane whereas others penetrate into the cell and target additional anionic intracytoplasmic constituents (e.g., DNA, RNA, proteins, or cell wall components).⁸ These mechanisms of action require an interaction with phospholipid bilayer within the cell membrane and numerous interaction models have been proposed, including the barrel-stave pore,⁷ the toroidal pore,⁹ the carpet like,⁷ the aggregate,¹⁰ and the detergent like models.¹¹

Due to the low degree of selectivity between microbial and host cells and the vulnerability of peptides to the rapid *in vivo* degradation, AMPs have yet to see widespread clinical use.⁵ Therefore, a strategy to improve the activity, selectivity and biodisponibility of natural peptides is to design pseudopeptides. Recently, numerous peptidomimetic systems have been developed in this field of biological application including β -peptides,¹²⁻¹⁴ peptoids,¹⁵⁻¹⁷ β -peptoids,^{18,19} and oligoureas.²⁰

In this work we try to improve the biological activity of a natural occurring AMP using aza- β^3 -aminoacids that are known to enhance the biodisponibility of biological active peptides, notably in immunology.²¹ These monomers are analogs of β^3 -aminoacids in which the CH_α is

replaced by a nitrogen stereocenter atom. This conferred a better flexibility to the pseudopeptide due to the side chain beared on a chiral nitrogen atom with non-fixed configuration.²² The nonnatural oligomers have an extended conformational space and are supposed to adopt non-canonical secondary structures. To date, no solution structures of peptides containing aza- β^3 -aminoacids have been resolved. Crystalline structures of linear aza- β^3 -peptides and aza- β^3 -cyclopeptidic macrocycles have been determined and exhibit an internal hydrogen-bond network leading to bifidic eight-membered ring pseudocycles, called N-N turn or hydrazino turn.²³⁻²⁵ Recently, it was demonstrated that the nitrogen configuration inversion could be fixed, by incorporating chiral monomers among these heteromacrocyles.²⁶

We first isolated and highlighted the antimicrobial properties of a short neuropeptide of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Seawater contains many invading microorganisms (up to 10^6 bacteria/mL and 10^9 virus/mL) and marine invertebrates have a large number of AMPs.²⁷ It was reported that some neuropeptides or peptidic hormones display structural similarities with antimicrobial peptides and exhibit antimicrobial activities.²⁸ This decapeptide AD have a moderate antimicrobial activity and a very low cytotoxicity on eukaryotic cells. Thus, it constitutes a suitable template to study the impact of the incorporation of aza- β^3 -aminoacids on the antimicrobial activity of an AMP. A large range of N^α -Fmoc protected aza- β^3 -aminoacids with proteinogenic and non proteinogenic side chains have been previously synthesized to be incorporated in peptidic sequences via solid-phase peptide synthesis (SPPS).²⁹⁻³²

The substitution of α -aminoacids by aza- β^3 -aminoacids is able to improve the activity of this marine AMP. Furthermore, we showed that depending on the location of this substitution, the peptide structures can be greatly affected. These modifications could either turn off or strongly enhance the antimicrobial activity, demonstrating that aza- β^3 -aminoacids can

modulate the three-dimensional structure and induce better interaction with the bacterial membranes.³³

Experimental Section

General Method for Peptide and Pseudopeptides Synthesis and Purification. All peptides (AD and AK) and the pseudopeptide A β^3 K were synthesized on an Advanced Chem Tech 440 Mos synthesizer® (Louisville, Ky., USA). Pseudopeptides K1Nal and K2Nal were synthesized on a Pioneer Peptide Synthesis System® (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA). Synthesis was accomplished using commercially available *N*^α-Fmoc-protected amino acid derivatives (Fluka; Sigma-Aldrich) and a Rink Amide resin (substitution 0.69 mmol/g, Bachem; Novabiochem). Synthesis of aza- β^3 -amino acids analogs used in this study has been described in detail elsewhere.²⁹⁻³² Each coupling reaction was achieved using a 4-fold excess of each of the amino acid, TBTU, and HOBt in the presence of a 8-fold excess of DIPEA for 1 h for standard amino acids residues and 2 h for aza- β^3 amino acids. Peptides were cleaved from the resin and deprotected simultaneously by using trifluoroacetic acid/H₂O/triisopropylsilane (95/2.5/2.5, v/v/v) and shaking for 4 h. Peptides and analogues were precipitated by evaporation of the deprotection solution and addition of cold anhydrous diethyl ether. Peptides and analogues were purified by reversed-phase HPLC on a X Terra RP18 semi-preparative column (10 μ m, 19 mm x 300 mm, Waters). The column was eluted with a linear gradient of acetonitrile in water (0.1% and 0.08 % trifluoro acetic acid respectively) at a flow of 8 mL/min.. The purified peptides and analogues were shown to be >95 % homogeneous by analytical HPLC with a X Terra RP18 analytical column (5 μ m, 4.6 mm x 250 mm, Waters) and their mass was confirmed by MALDI TOF MS and MicroLC-ESI-MS/MS analysis. Peptide and analog concentrations for all experiments were calculated as the TFA salt (assuming association of one molecule of TFA per cationic residue).

Antimicrobial assays. The antimicrobial activity of peptides and pseudopeptides was assayed against several bacterial species including Gram-positive *Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*; Gram-negative *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* and also marine bacteria including *Vibrio aestuarianus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* and *V. splendidus*.³⁴ The minimal growth inhibition concentration (MIC) was determined in triplicate by liquid growth inhibition assays. Briefly, 10 µl of peptide (final concentration of 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 620 µg/mL) or 10µl of deionized water as a control, were incubated in microtiter plates (96 wells) with 100 µl of a suspension of midlogarithmic phase culture of bacteria at a starting optical density of $D_{600} = 0.001$. Poor-broth nutrient medium (PB: 1% peptone, 0.5% NaCl, w/v, pH 7.5) was used for standard bacterial cultures, pathogenic bacteria being grown in PB supplemented with 0.3% of beef extract (Bacto, BD) except *E. faecalis* and *L. monocytogenes* which being grown in brain heart infusion (BHI, BBL, BD), and marine bacteria being grown in Saline PB (SPB: 1% peptone, 1.5% NaCl, w/v, pH 7.2). Cultures were grown for 20 h with vigorous shaking at 30 °C. Microbial growth was assessed by measurement of the optical density at D_{595} after the 20 h incubation. MICs (expressed in µM) are the lowest concentration tested that caused 100% growth inhibition within the triplicate.

Cytotoxicity assay. Cytotoxicities of peptides and pseudopeptides on CHO-K1 cells was determined by the colorimetric MTT (3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) dye reduction assay. Briefly, 1.34×10^4 cells/well in Ham F12 supplemented with L-glutamine (Gibco) and 10 % foetal calf serum (Eurobio) were placed into 96-well plates. After incubation for 24 h under a fully humidified atmosphere of 95% room air and 5% CO₂ at 37 °C, peptides and pseudopeptides was added to cell cultures at a final concentration of 10, 40, 160 and 640 µg/ml. Toxicity was evaluated after 24 h of incubation by measuring the

optical density of the culture at 570 nm using the cell growth determination kit (Sigma) based on conversion of the yellow tetrazolium salt MTT into purple formazan crystals by metabolically active cells.

Hemolytic activity. The hemolytic activity of peptide AK and pseudopeptide K1Nal was determined based on hemolysis of rabbit red blood cells (rRBCs). The rRBCs were isolated from rabbit blood: 1 mL of blood was deposited into a tube containing 2 mL of phosphate buffer saline (PBS). The rRBCs were then isolated by centrifugation at 1000g for 5 min and washed 3 times with PBS. The washed rRBCs were resuspended in 10 ml of PBS to attain a dilution of about 1% of the erythrocyte volume initially collected. 90µl of rRBCs solution were incubated with 90µl of different peptide concentrations dissolved in PBS buffer for 1 hour at 37°C. The samples were centrifuged for 5 min and hemolysis was determined by measuring the optical density of the supernatant at 415 nm. Zero hemolysis (blank) and 100% hemolysis were determined in PBS buffer and 1% Triton X-100, respectively.

Circular dichroism. CD experiments were carried out using a JASCO J-815 spectropolarimeter (Easton, USA) equipped with Peltier devices for temperature control. CD spectra were measured on a JASCO-810 spectropolarimeter. All of the spectra were obtained with a quartz cell of 0.2 mm path length. Spectra were recorded at a peptide concentration of 100 µM in different environments: water, phosphate buffer 10 mM, in 50% TFE, in presence of SDS detergent (30 mM). The baseline-corrected spectra were smoothed, ellipticities were converted to mean residue molar ellipticities in degree cm².d.mol⁻¹, and the helical content was estimated as previously described.³⁵

NMR experiments. The NMR samples contained 1 mM of AD/AK/Aβ³K/K2Nal peptide dissolved in aqueous (90% H₂O, 10% D₂O) or in micellar solutions of 10-50 mM SDS d-25 (Euriso-top), the pH was adjusted to 5.0. AK peptide samples were prepared with similar concentrations and pH. All spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer

equipped with a 5 mm triple-resonance cryoprobe (^1H , ^{13}C , ^{15}N). Homonuclear 2-D spectra DQF-COSY, TOCSY (MLEV) and NOESY were recorded in the phase-sensitive mode using the States-TPPI method as data matrices of 256 real (t_1) \times 2048 (t_2) complex data points; 64 scans per t_1 increment with 1.5 s recovery delay and spectral width of 5341 Hz in both dimensions were used. The mixing times were 100 ms for TOCSY and 200 ms for the NOESY experiments. In addition, 2D heteronuclear spectra ^{13}C -HSQC and ^{13}C -HMBC were acquired to help to fully assign the naphthylalanyl side chains. Spectra were processed with Topspin or the NMRpipe/NMRdraw software package and visualized with Topspin or NMRview on a Linux station. The matrices were zero-filled to 1024 (t_1) \times 2048 (t_2) points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced to the solvent chemical shifts.

Structure calculations. ^1H chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software. Structure calculations were performed with the ARIA 2.2 software. The calculations were initiated using the default parameters of ARIA and a nearly complete set of manually assigned NOE. Some CNS and ARIA files were modified to take into account in the calculation for the aza- β^3 residues. The torsion angle ϕ was restrained to $-60 \pm 40^\circ$ for $^3J_{\text{HN-HA}} < 6$ Hz. At the end of each run, violations and assignment proposed by ARIA were checked before starting a new run. This process was repeated until all the NOE were correctly assigned and no restraints were rejected. A last run of 100 structures was performed, a set of 20 structures of lowest energies with no violation $> 0.3 \text{ \AA}$ were considered as representative of the peptide structure. Representation and quantitative analysis of the calculated structures were performed using MOLMOL and PyMOL. The PROCHECK program was used to assess the stereochemical quality of the structures.

Results

Design of antimicrobial analogs. With its net charge of +1 at physiological pH and its short sequence, the natural mollusc neuropeptide, called AD, displays an unexpected antimicrobial activity. This peptide with a relative low activity but a high selectivity provides us a suitable template to design new efficient antimicrobial pseudopeptides.

We first substituted the aspartic acid in position 5 by a lysine (D5K), increasing the net positive charge to enhance favourable electrostatic interactions with the globally negatively charged bacterial membranes. This AD analog, noted AK, displays a net charge of +3 and an isoelectric point (pI) of 14, instead of 11 for AD, at physiological pH. Subsequently, based on the AK sequence, three pseudopeptidic analogues containing standard α -amino acids and aza- β^3 residues were synthesized. Aza- β^3 -amino acid monomers correspond to aza derivatives of β^3 amino acids or N^α -substituted hydrazino acetic acid monomers. They are new building blocks with side chains beard by “free configuration chiral center” N_α nitrogen atoms.²² Substitution of α -amino acid residues by aza- β^3 -amino acid residues prevents stereochemical constraints and may contribute to enhance proteolytic resistance.²⁹⁻³²

The first pseudopeptide A β^3 K was designed based on the AK analog, replacing the lysine in position 5 by an aza- β^3 -lysine. The two others pseudopeptidic analogues, K1Nal and K2Nal, are also derived from the peptide AK. The phenylalanine residues in position 7 and 10 were replaced by two aza- β^3 -aminoacid residues carrying non-proteinogenic naphthylalanyl side chains. The residues with these types of aromatic hydrophobic side chains were already known to enhance the interaction of antimicrobial peptides with the lipid bilayers.³⁶ The peptides and the mixed α - and aza- β^3 -pseudopeptides were obtained with good yields from 8% to 55% and their purity was >95%. Their characteristics are reported in Table 1.

Antibacterial activities. The MICs of the peptide AD and its analogues were determined on four Gram positive bacteria (*B.megaterium*, *E.faecalis*, *L.monocytogenes*, *S.aureus*), and

eight Gram negative bacteria (*E.coli*, *S.thyphimurium*, *P.aeruginosa*, *K pneumonia*) whose four are marine bacteria (*V.harveyi*, *V.alginolyticus*, *V aestuarianus* and *V.splendidus*).³⁵ The results are represented in Table 2 which allows comparison of the antibacterial activities of these analogues with the endogenous peptide AD and a common antibiotic (ampicillin). For the natural peptide, no activities were observed for several bacteria otherwise MICs values are relatively high (292 and 584 μ M), which confirm that its implication in the cuttlefish immunity should be limited. Nevertheless, its antimicrobial spectrum is narrow and AD is particularly active against the marine *Vibrio* bacteria. These selective antimicrobial activities may have some relevance *in vivo* since these bacteria are potential pathogens for the cuttlefish in its natural environment. This weak efficiency against pathogenic bacteria for mammals suggested that this peptide could be a good candidate in order to evaluate the effect of the introduction of different natural or non natural amino acids such as the aza- β^3 -aminoacids, in the native peptide sequence.

The peptidic analog AK possesses a larger antibacterial spectrum than native AD. AK is active on all Gram negative bacteria tested and becomes active on the pathogenic Gram positive bacteria *S.aureus* responsible for numerous human infections. Moreover, a concentration of 65 μ M is sufficient to inhibit the growth of well-known bacteria *E.coli* and *B.megaterium*. The MICs are 8 times smaller than AD's MICs. It is also important to notice that marine bacteria are particularly affected by this peptide since a low concentration (33 μ M) inhibits the growth of *V.splendidus*. MICs measured on *V.harveyi* and *V.alginolyticus* are even lower than ampicillin's MIC.

Our first attempt to design AMPs with aza- β^3 -aminoacids is quite surprising since the pseudopeptide A β^3 K is inactive on all the bacteria except on *V.splendidus*. As the net charge is the same for AK and A β^3 K, the difference of activity has to be related with structural difference between the two peptides. In contrast, both pseudopeptides K1Nal and K2Nal

containing aza- β^3 -naphthylalanine residues are shown to be very active with broad antibacterial spectrum. K1Nal is active on 11 of the 12 tested bacterial strains and K2Nal is active on all the tested bacteria. The lowest K1Nal, MIC (15 μ M) is observed for two Gram positive bacteria (*B.megaterium* and *S.aureus*). This MIC value on *S.aureus* is equivalent to that of ampicillin and is up to 18 times lower than the observed value of the peptidic analogue AK. Among Gram negative bacteria, K1Nal is active on potentially pathogenic bacteria *E.coli* and *S.thyphimurium* (MICs respectively of 30 and 59 μ M) and hold a MIC 7 times lower than the ampicillin on *P.aeruginosa*, a bacterium frequently responsible of nosocomial infections. Only *K.pneumoniae* is K1Nal-resistant in the range of tested concentrations and it is also interesting to note that all the marine bacteria are less sensitive to this pseudopeptide than to the peptide AK. The pseudopeptide K2Nal which is active on all the tested bacteria displays generally higher MICs than K1Nal. Its strongest MIC (59 μ M) is only observed on *S.aureus* however K2Nal slows down the proliferation of *K.pneumoniae* with the highest tested concentration (473 μ M). K1Nal and K2Nal are the first AMPs based on aza- β^3 -aminoacids.

Hemolytic activity. The activities of analogs AK and K1Nal on rRBCs are shown in [Table 3](#). No significant hemolytic activities (<1,5%) were observed for concentration up to 160 μ g/mL (131 μ M for AK and 118 μ M for K1Nal), indicating selectivity for bacterial cells over mammalian cells. .

Study of *in vitro* cytotoxicity of analogs. The cytotoxic activity of natural neuropeptide AD and two of its analogs (AK and K1Nal) on Chinese Hamster Ovary (*CHO-K1*) cell line at 10, 40, 160 and 640 μ g/ml are illustrated in [Figure 1](#). These results show that peptides are not cytotoxic in the range of the tested concentrations. For the pseudopeptide, the smallest doses of K1Nal tested (10 and 40 μ g/ml) were not cytotoxic to CHO-K1 cells. However, K1Nal was slightly cytotoxic (78% of viability) at 160 μ g/ml (118 μ M) and toxic at 640 μ g/ml (473 μ M),

but this later concentration is 8 times higher than its MICs against human pathogens *L.monocytogenes* and *S. typhimurium* and 32 times higher than its MICs against *S.aureus*.

Circular dichroism analysis. The CD spectra of the endogenous peptide (AD) and its peptidic analog AK at 100 μ M are presented in Figure 2A and 2B, respectively. The pattern is similar for the two peptides and underlines an identical structural behaviour in several media. These two peptides present a random coil CD profile in phosphate buffer (10 mM KP, pH 7,4) and a typical helical signature in hydrophobic environments. Indeed, in 50% TFE or in the presence of SDS micelles, the CD spectra exhibit a maximum at 190 nm and two minima towards 208 and 222 nm showing that AD and AK adopt a helical structure in this two lipid membrane mimicking media. Nevertheless, we can notice these short peptides (10 residues) cannot form more than one to two helix turns (3,6 residues per turn).

Interestingly the A β^3 K displays a random profile in phosphate buffer, but a particular profile in hydrophobic media with a thin minimum at 202 nm. The extinction of the activity of A β^3 K may be caused by the loss of helicity in membrane mimics media due to the incorporation of the aza- β^3 -K in position 5. In the case of pseudopeptides K1Nal and K2Nal (Figures 2C and 2D), interpretation of the CD spectra is difficult due to the strong absorbance of the aromatic nuclei of aza- β^3 -naphthylalanine residues that perturbs the characteristic profiles of normal peptides. Nevertheless, the pseudopeptides K1Nal and K2Nal are clearly in random coil conformation in phosphate buffer. In contrast, dramatic changes are observed in 50% TFE and especially in the presence of SDS micelles. This K1Nal specific profile is characterized by a couplet centered at 223 nm with a maximum at 217 nm and a minimum at 228 nm and the K2Nal spectrum exhibit the same pattern with a couplet centered at 226 nm with a minimum at 221 nm and a maximum at 229 nm. Based on previous work realized on poly(L-1-naphthylalanine), poly(L-2-naphthylalanine) peptides^{37,38}, the center wavelength around 225 nm is related with the ¹B_b transition of a naphthalene group in presence of SDS

micelles. The aromatic nuclei of the aza- β^3 -naphthylalanine are separated by two other along its long axis. This CD spectrum points out a stacking of the bulky aromatic residues in the bound state residues which is consistent with a probable helix conformation.³⁹ This interpretation is further supported by a similar spectrum when studying the K2Nal pseudopeptide in presence of SDS micelles. Well defined structures for these pseudopeptides in presence of SDS micelles are also demonstrated when performing thermal stability studies. The K2Nal data presented in Fig.2D display a progressive decrease of the CD intensities of the ellipticity maxima for both positive and negative maximum when increasing the temperature. However, the CD profile, although weaker, is still present at 80°C. We already observed the same phenomenon when we modified the temperature of the native neuropeptide sample in the presence of SDS micelles. We indeed noticed that the characteristic spectral profile of α -helix remains stable until 90°C (data not shown). These relatively high thermal stabilities for such a small peptide is in good agreement with well defined secondary structures.

NMR experiments and structure calculations. As the CD spectra revealed that the four peptides AD, AK, a β^3 K and K2Nal can adopt particular conformations in presence of SDS micelles, NMR structural studies were lead in aqueous solution with SDS detergent. 1D spectra were first recorded at concentrations around 1 mM for each peptide increasing SDS concentrations (until 200 mM SDS). Up to 50 mM SDS, variations in chemical shifts and line width narrowing could be observed, and then no change occurred at higher concentrations for all the peptides. The detergent concentrations were subsequently set at 50 mM for the further experiments. The proton assignment (supplemental data) was straightforward using the COSY, TOCSY and NOESY spectra. Nevertheless, due to protons overlaps of the naphthylalanyl side chains, ¹³C-HSQC and HMBC were recorded to remove ambiguities and fully assigned these aromatic protons. In the case of a β^3 K and K2Nal, as the aza- β^3 amino

acids do not bear a H_α proton and no spin systems can be observed for these pseudoresidues on the TOCSY spectra. However, the typical amide protons singlet near 9 ppm of the aza- β^3 residues permit to easily identify the aza- β^3 residues spin systems on the NOESY spectra. Then the strong NOEs between H_β of the aza- β^3 residues and the amide proton of the previous amino-acids on the NOESY spectra allow us to check the sequential assignment. Where possible, NOEs were assigned based on unambiguous chemical shift assignments, but due to chemical shift overlap, ambiguous NOEs were also incorporated and used by ARIA.

In the final ARIA run, the AD structure was calculated using 147 distance restraints and 5 dihedrals restraints for the Leu2, Asp5, Ala6, Leu8 and Arg9 residues. At the last iteration, 60 structures were refined in a shell of water, the 20 lowest energy conformers with no distance violations > 0.3 Å and a good stereochemical quality are represented in [figure 3A](#). The structural statistics of this bundle of structures are shown [Table 4](#). The global fold of AD displays a disordered N-terminal region and a well-defined helical C-terminal moiety (5-10). Indeed, the backbone RMSD on the whole structure is 1.312 Å and fall to 0.163 Å if the poorly defined N-terminal moiety is ignored. The backbone and the heavy atoms RMSD on different regions of the peptides are shown [Table 4](#). We can notice on the [figure 3A](#), that the polar residues Asp5 and Arg9 are aligned on the same side of the C-terminal helix turn. In the opposite side, a large hydrophobic surface is composed of the Ala6, Phe7, Leu8 and Phe10, thus the AD C-terminal moiety is well-ordered and amphipatic. Then, to solve the AK structure, 170 distance restraints and 5 dihedral restraints (Lys5, Leu6, Phe7, Leu8, Arg9) were used in the final iteration of ARIA. The proton chemical shifts of AK are very close to this of AD and, as expected, the global fold of AK ([figure 3B](#)) is similar to the AD structure with a disordered N-terminal moiety and a well-defined C-terminal helical turn from Lys5 to Phe10. Consequently, the effect of the mutation D5K on the neuropeptide structure is very slight and do not alter its amphipatic property.

The A β^3 K peptide is based on AK, substituting the lysine in position 5 by an aza- β^3 -lysine. As describe previously, the stereochemistry of the nitrogen bearing the side chain of the aza β^3 residues are not fixed, thus the configuration of the stereocenter of the Aza- β^3 -lys5 was not defined in the CNS topology and parameter files. The final restraint file of A β^3 K comprised a set of 213 distance restraints and 3 dihedral restraints. In the 20 selected structures, we observe two set of conformations according to the configuration R or S of the N $^\alpha$ stereocenter of the Aza- β^3 -lys5. Respectively, 15 and 5 structures are composed with a R- and a S- aza- β^3 -lys5. On contrary to the AD and AK structures, the backbone of the A β^3 K peptide is quite well-defined all along the structure as we can see on the [figure 3C](#) and [4A-B](#). Moreover, its global fold is very different and do not exhibit a helical C-terminal moiety as the two previous peptides anymore. We observe, on the [figure 4C](#), that the introduction of the Aza- β^3 -lys induces a hydrazinoturn or N-N turn which has been previously shown in CDCl₃ and describe in aza- β^3 -peptide crystals structures. The amide proton of Leu6 is H-bonded with both the lone paire of the sp³ nitrogen atom of the Aza- β^3 -lys5 (6.HN-5.N $^\alpha$ = 2.33 Å) and the carbonyle of Gly4 (6.HN-4.CO = 1.81 Å). We have also measure four characteristic torsional angles ω , ϕ , θ and ψ for the R- and the S- hydrazinoturn, they are displayed on the [Table 5A](#). Interestingly, this particular turn lead to the formation of two β -turns composed of the residues 2-5 and 5-8 on each side of the hydrazinoturn. They are stabilize by hydrogens bond between the carbonyle of Leu2 and amide protons of Gly4 (2.O-4.HN = 1.83 Å) and Aza- β^3 -lys5 (2.O-5.HN = 2.31 Å), and carbonyle of Aza- β^3 -lys5 and amide protons of Phe7 (5.O-7.HN = 1.82 Å) and Leu8 (5.O-8.HN = 2.33 Å). This specific folding feature is particularly stable and strong NOEs peaks can be detected on the NOESY spectrum between the amide protons 2.HN-3.HN, 4.HN-5.HN, 7.HN-8.HN, 9.HN-10.HN.

Surprisingly, NMR 2D-NOESY spectrum of the pseudopeptide K2Nal in SDS micelles display few NOEs comparing to the three others peptides pointing out the high flexibility of

the K2NaI. Moreover, several amide protons linewidth in 1D NMR spectra exhibit different behaviors varying the temperature, which probably result from conformational motions. As a result, the NMR structure calculations do not converge and no dominant conformation can be determined.

Discussion

In this study we demonstrated that the cuttlefish neuropeptide H-ALSGDAFLRF-NH₂ extract from *Sepia officinalis* presents antibacterial activities. This regulating peptide belonging to the FaRPs⁴⁰ has known functions modulation effects on the chromatophores and on the reproductive contractile organs.^{41,42} This short cephalopod-specific decapeptide is the first neuropeptide of invertebrates described as possessing an antibacterial activity. This neuropeptide possesses a narrow-spectrum antibacterial activity and acts more particularly on marine origin bacteria of the genus *Vibrio*. However, its thresholds of activity on the tested bacteria are relatively high because the weakest observed MICs are superior to 150 μ M. It seems thus not very credible that this marine neuropeptide plays a role in the immunity of the cuttlefish. Indeed, its MICs seem widely superior to others marine antimicrobial peptides. For example, the mussel defensin MGD-1 of *Mytilus galloprovincialis* exhibit MICs 25 to 100 times inferior.⁴³ So, it is very likely that the antibacterial properties observed for this peptide result from the close homologies between short neuropeptides and AMPs. Like AMPs, AD possess a hydrophobic ratio of more than 50%, a positive net charge due to the amide function at the C-termini, and exhibit a good affinity for the plasmic membrane where it adopts its α -helical conformation. The NMR three-dimensional structure of AD in SDS is reliable to other structures of short neuropeptides belonging to tachykinin family obtained in DPC micelles. The structure is divided in two parts: a well-defined α -helical C-terminal domain considered as responsible for activating the membrane G-protein coupled receptor and a more flexible N-

terminal domain suspected to be responsible of the subtypes receptor specificity.⁴⁴ This structure has the peculiarity to be amphipatic, a common characteristic of AMPs.

With the aim of improving the antibacterial properties of this natural neuropeptide, we synthesized one peptidic analog and four pseudopeptidic analogs of this sequence. It is expected that the antimicrobial activity can be increased by the enhancement of the positive net charge, so we chose to replace the negative aspartic acid residue in position 5 by a positive lysine residue. The AK analog keeps the same hydrophobic ratio but possesses a net charge of +3. This simple substitution considerably improves the antibacterial activity of the natural peptide. The AK antibacterial activity spectrum is broadened; AK is active on ten of twelve tested bacterial strains while the endogenous peptide affects only six. AK's MICs on bacterial strains are significantly lowered compared to AD's MICs (MICs 8 times lower on bacteria *B.megaterium*, *E.coli*, *V.splendidus* and *V.aestuarianus*). Stronger antimicrobial activities of AK have to be connected with the cytotoxicity. AK is not hemolytic until 131 μ M and a concentration of 524 μ M is not lethal for CHO-K1 eukaryotic cells. So, AK appears slightly less cytotoxic than the endogenous peptide and possesses an improved antimicrobial power demonstrating that we have improved the cell selectivity. It also underlines the importance of the peptide net charge in the phenomenon of interaction with the bacterial membrane. CD spectra show that unstructured AK in solution adopts a helical conformation in hydrophobic environments as endogenous neuropeptide AD. The AK solution structure in SDS micelles is similar to AD with a well defined amphipathic helical C-terminal moiety, and a disordered N-terminal part. AK is composed of one hydrophilic homing domain formed by the two cationic residues (arginine and lysine) which are exposed at the same side of the short helix. This cationic part should be responsible of the anchorage of the peptide on negatively charged headgroup of bacterial phospholipids. The highly hydrophobic counterpart of the helix (2

phenylalanines, 1 leucine and 1 alanine) may initiate the burying of the AMP in the hydrophobic core of the lipid bilayer.

The results obtained with pseudopeptidic analogs containing aza- β^3 -residues have to be divided into two parts. We focus first on the analogue A β^3 K (AK lysine in position 5 substituted by aza- β^3 -lysine) which is inactive on all the bacteria tested except *V.splendendus*. This absence of activity indicates that the incorporation of aza- β^3 -aminoacids can switch off the biological activity. Interestingly, the pseudopeptide A β^3 K displayed an atypical CD profile in presence of micelles of SDS which may be attributed to the presence of turns within the peptidic backbone as β -turns or γ -turns. Indeed, the NMR solution structure of A β^3 K is clearly different than two peptides AD and AK. The incorporation of an aza- β^3 -residue in a central position induces a particular hydrogen bond network along the backbone due to the bifidic hydrazino-turn formed by the aza- β^3 -lysine and the two flanking α -aminoacids (G4 and A6). Moreover, this hydrogen bond formation imposes spatial constraints and favors the formation of two β -turns (β -turns 2-5 and 5-8) associated with two γ -turns (γ -turns 2-4 and 5-7) involving the three α -aminoacids on both sides of the aza- β^3 -residue. Indeed, the A β^3 K solution structure exhibits a hydrazinoturn surrounded by two β -turns. To our knowledge, this work describes the first NMR three-dimensional structure of a hybrid pseudopeptide including one aza- β^3 -residue in aqueous medium. The presence of two sets of structure with the R and S configuration of the aza- β^3 -Lysine does not necessary mean that the two populations can be found in solution but reflect the fact that the distance restraints used in the NMR structure calculations can be satisfied by the R and S configuration. The well-ordered bioactive peptides C-terminal parts are dramatically modified by the incorporation of only one aza- β^3 -residue which induces a loss of the amphipatic properties of the pseudopeptide. These result

underline the major function of the C-terminal moiety of AD and AK, and the role of the amphipaticity to the peptides antimicrobial activity.

The second pseudopeptides type consists of analogs K1Nal and K2Nal which contain aza- β^3 -naphthylalanine residues in position 7 and 10 in the C-terminal part of the pseudopeptide. It was already demonstrated that the replacement of tryptophane residues by naphthylalanine residues within antimicrobial peptidic sequences increase the antibacterial activity. Nevertheless, this improvement is very often accompanied with a decrease of the selectivity.^{45,46} Synthetic peptides containing naphthylalanine amino acid are normally more hemolytics with regard to parent peptides. Naphthylalanine residue indeed possesses an aromatic nucleus close to the hydrophobic indole nucleus, thus, these residues facilitate the AMPs burying within the hydrophobic heart of the lipid bilayers. In this study, we substituted both phenylalanine of the AK peptidic sequence by aza- β^3 -1-naphthylalanine to give the pseudopeptide K1Nal or by aza- β^3 -2-naphthylalanine in the case of K2Nal. Besides the effects on the structuration of the peptide due to the incorporation of aza- β^3 -aminoacid residues, the replacement of the phenylalanine residues by much more hydrophobic naphthalene moieties can also have important consequences on MICs and on the specificity of antimicrobial pseudopeptides. The two pseudopeptides K1Nal and K2Nal are more active than the peptides and pseudopeptide previously described. K2Nal presents an activity on the twelve tested bacterial strains and only *K.pneumoniae* is resistant to the pseudopeptide K1Nal in the range of tested concentrations. Nevertheless, K1Nal seems to be more appropriate than K2Nal in a therapeutic context because it possesses lower MICs on most of the tested pathogenic bacteria. It is necessary to note that the difference of the chemical bond location which connects the naphthalene aromatic cycle and the α carbon between aza- β^3 -1-naphthylalanine and aza- β^3 -2-naphthylalanine have an importance on the specificity among

the different bacterial strains. The bacterial specificity of these two pseudopeptides is modified because they both appeared less active than AK on marine origin bacteria. Also, the comparison between AK MICs and pseudopeptides ones shows that K1Nal is 16 times more active on the pathogenic bacterium *S.aureus* and both pseudopeptides inhibit the proliferation of *L.monocytogenes* which is AK-resistant. Another important fact is that both pseudopeptides are more effective on *P.aeruginosa* (bacteria highly unresponsive to many antibiotic treatments) than the common antibiotic ampicillin. K1Nal appeared more cytotoxic because is lethal for eukaryotic CHO-K1 cells at 640 µg/mL. However, the pseudopeptide K1Nal does not present hemolytic activity on rabbit erythrocytes until a concentration of 129 µM and furthermore, more than 80 % of mammalian cells CHO-K1 are still viable at this concentration. This demonstrates that K1Nal is not cytotoxic at this concentration which inhibits the growth of seven of the tested bacteria. CD spectroscopy points the fact that aromatic nuclei tends to be closer when pseudopeptides are in presence of SDS micelles. CD spectra in SDS 30 mM exhibit a typical spectral profile (couplet) which can be explained by the close meeting of excited states of naphthalene aromatic nuclei. The stacking of the aromatic nuclei is supported by the fact that pseudopeptide fluorescence intensities in SDS micelles are very higher than in phosphate buffer confirming (data not shown). Dathe and coworkers obtained the same type of CD profiles with cyclic antimicrobial hexapeptides RNal (*cyclo*[-R-R-1Nal-1Nal-R-F-]) in contact with SDS micelles or POPG SUV. This cyclopeptide contains two α -L-naphthylalanine residues and exhibits, in membrane like environment (micelles or SUV), a CD spectrum displaying a couplet centered at 227 nm with a maximum of positive ellipticity at 222 nm and a maximum of negative ellipticity at 232 nm

⁴⁵ It is very important to note that this type of couplet is inversed in the case of an antimicrobial D-peptide containing β -D-naphthylalanine residues. D-Nal-Pac-525 (*Ac*-k-nal-r-r-nal-v-r-nal-i-NH₂) present the same type of couplet centered towards 225 nm but with

opposite sign for the maxima (a positive ellipticity maximum at 229 nm and a negative maximum at 220 nm) when it is put in contact with LUV or SDS micelles.⁴⁶ In the case of our pseudopeptides, the aromatic side chains are carried by chiral nitrogen atoms with a non-fixed configuration. Thus, CD spectra of pseudopeptides in SDS micelles seem to indicate that the side chains are preferentially positioned in an orientation similar to α -naphthylalanine with L configuration (absolute configuration S). Nevertheless, NMR 2D-NOESY spectrum of the pseudopeptide K2Nal in SDS micelles display few NOEs comparing to the three others peptides pointing out the high flexibility of the K2Nal. As a result, the NMR structure calculations do not converge. Moreover, several amide protons linewidth in 1D NMR spectra exhibit different behaviors varying the temperature which probably result from conformational motions. In consequence, the structural features of this peptide may not be determinant for its strong biological activity. NMR data therefore suggest that the loss of ellipticity maxima of K2Nal CD spectra obtained when the temperature is improved is not due to a loss of structuration. The more probable explanation is the increase of the thermal agitation that repels the aromatic nuclei positioned inside the SDS micelles. All these data suggest that the strong observed antimicrobial activity of K2Nal is not due to stable structuration but to its physicochemical properties that provide a better affinity for lipid bilayers.

Conclusion

This article reports the first antibacterial activity observed for a marine invertebrate neuropeptide. CD and NMR data show that as the majority of natural occurring antimicrobial peptides it adopts an amphiphile α -helical conformation at the membrane interface. The importance of the cationic net charge is demonstrated by the improvement of the antibacterial activity by a simple acid aspartic to lysine substitution without affecting the structuration. On

the other hand, the incorporation of only one aza- α^3 -aminoacid residues can lead to a drastic rearrangement of the peptidic backbone resulting in a loss of antibacterial activity. In contrast, substitution of two phenylalanines by two aza- α^3 -naphthylalanine residues provides antimicrobial pseudopeptides with a great therapeutic potential³³ due to their lack of high cytotoxicity. Interestingly, the two more biologically active pseudopeptides are the less structured in micellar environment demonstrating that a rigid structuration is not necessary to exhibit strong antibacterial activity.

REFERENCES

- (1) Andreu, D.; Rivas, L. *Biopolymers* **1998**, *47*, 415-433.
- (2) Epand, R.M.; Vogel, H.J. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 11-28.
- (3) Hancock, R. E. W.; Chapple, D.S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1317-1323.
- (4) Zasloff, M. *Nature* **1999**, *415*, 389-395.
- (5) Hancock, R. E.; Sahl, H. G. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1551-1557.
- (6) Peschel, A.; Sahl, H. G. *Antimicrob. Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 529-536.
- (7) Shai, Y. *Biopolymers* **2002**, *66*, 236-248.
- (8) Brogden, K. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238-250.
- (9) Matsuzaki, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 391-400.
- (10) Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R. E. W. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7235-7242.
- (11) Bechinger, B.; Lohner, K. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1529-1539.
- (12) Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7324-7330.
- (13) Arvidsson, P. I.; Ryder, N. S.; Weiss, H. M.; Gross, G.; Kretz, O.; Woessner, R.; Seebach, D. *Chembiochem* **2003**, *4*, 1345-1347.
- (14) Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6848-6849.
- (15) Song, Y. M.; Park, Y.; Lim, S. S.; Yang, S. T.; Woo, E. R.; Park, I. S.; Lee, J. S.; Kim, J. I.; Hahm, K. S.; Kim, Y.; Shin, S. Y. *Biochemistry* **2005**, *44*, 12094-12106.
- (16) Zhu, W. L.; Song, Y. M.; Park, Y.; Park, K. H.; Yang, S. T.; Kim, J. I.; Park, I. S.; Hahm, K. S.; Shin, S. Y. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1768*, 1506-1517.

- (17) Chongsiriwatana, N. P.; Patch, J. A.; Czyzewski, A. M.; Dohm, M. T.; Ivankin, A.; Gidalevitz, D.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *105*, 2794-2799.
- (18) Shuey, S. W.; Delaney, W. J.; Shah, M. C.; Scialdone, M. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1245-1248.
- (19) Olsen, C. A.; Bonke, G.; Vedel, L.; Adersen, A.; Witt, M.; Franzyk, H.; Jaroszewski, J. W. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1549-1542.
- (20) Violette, A.; Fournel, S.; Lamour, K.; Chaloin, O.; Frisch, B.; Briand, J. P.; Monteil, H.; Guichard, G. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 531-538.
- (21) Dali, H.; Busnel, O.; Hoebeke, J.; Bi, L.; Decker, P.; Briand, J. P.; Baudy-Floc'h, M.; Muller, S. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 3024-3036.
- (22) Cheguillaume, A.; Salaün, A.; Sinbandhit, S.; Potel, M.; Gall, P.; Baudy-Floc'h, M.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4923-4929.
- (23) Salaün, A.; Potel, M.; Roisnel, T.; Gall, P.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70* (16), 6499-6502.
- (24) Le Grel, P.; Salaün, A.; Potel, M.; Le Grel, B.; Lassagne, F. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71* (15), 5638-5645.
- (25) Salaün, A.; Mocquet, C.; Perochon, R.; Lecorgne, A.; Le Grel, B.; Potel, M.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73* (21), 8579-8582.
- (26) Mocquet, C.; Salaün, A.; Claudon, P.; Le Grel, B.; Potel, M.; Guichard, G.; Jamart-Grégoire, B.; Le Grel, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, (preprint).
- (27) Tincu, J. A.; Taylor, S. W. *Agents Chemother.* **2004**, *48* (10), 3645-3654.
- (28) Brogden, K. A.; Guthmiller, J. M.; Salzet, M.; Zasloff, M.; *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 558-564.
- (29) Busnel, O.; Bi, L.; Baudy-Floc'h, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7073-7075.
- (30) Busnel, O.; Bi, L.; Dali, H.; Cheguillaume, A.; Chevance, S.; Bondon, A.; Muller, S.; Baudy-Floc'h, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10701-10708.
- (31) Busnel, O.; Baudy-Floc'h, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5767-5770.
- (32) Laurencin, M.; Bauchat, P.; Baudy-Floc'h, M. *Synthesis* **2009**, *6*, 1007-1013.
- (33) Baudy-Floc'h, M.; Zatylny-Gaudin, C.; Henry, J.; Duval E.; Laurencin, M. *SERB patent* **2007**, N° FR 07 09054.
- (34) Duval, E.; Zatylny, C.; Laurencin, M.; Baudy-Floc'h, M.; Henry, J. *Peptides* **2009**, *30*, 1608-1612.
- (35) Javapour M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C. J.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B.; Cowell, S. M.; Becker, C. L.; McLaughlin, M. L. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 3107-3113.
- (36) Haug, B. E.; Svendsen, J. S. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 190-196.

- (37) Sisido, M.; Egusa, S.; Imanishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4077–4082.
- (38) Sisido, M.; Egusa, S.; Imanishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1041–1049.
- (39) Sisido, M.; Imanishi, Y. *Macromolecules*, **1986**, *19* (8), 2187–2193.
- (40) Li, C.; Kim, K. *Neuropeptides, WormBook* **2008**, *25*, 1–36.
- (41) Henry, J.; Zatylny, C.; Boucaud-Camou, E. *Peptides* **1999**, *20*, 1061-1070.
- (42) Loi, P.; Saunders, R.; Young, D.; Tublitz, N.; *J Exp Biol.* **1996**, *199*, 1177-1187.
- (43) Hubert, F.; Noel, T.; Roch, P. *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *240* (1), 302-306.
- (44) Ganjiwale, A. D.; Cowsik, S. M. *J Struct Biol.* **2009**, *167*(2), 176-184.
- (45) Dathe, M.; Nikolenko, H.; Klose, J.; Bienert, M. **2004**, *Biochemistry* *43*, 9140-9150.
- (46) Wu, J. M.; Wei, S. Y.; Chen, H. L.; Weng, K. Y.; Cheng, H. T.; Cheng, J. W. **2007**, *Biopolymers* *88*, 738-745.

ACKNOWLEDGMENT

We thank SERB Laboratories and Region Bretagne for their financial support.

TABLES.

Table 1. Name, peptidic or pseudopeptidic sequences, analytical HPLC retention time (Rt in minutes) and SPPS yields of the endogenous peptide and its analogs.

| Name | Peptidic or Pseudopeptidic Sequences | Rt | Yields |
|-------------------|---|------------|--------|
| AD | H-ALSGDAFLRF-NH ₂ | 17,30 min. | 26% |
| AK | H-ALSGKAFLRF-NH ₂ | 16,91 min. | 40% |
| Aβ ³ K | H-ALSG-aza-β ³ K-AFLRF-NH ₂ | 17,32 min. | 8% |
| K1Nal | H-ALSGKA-aza-β ³ (1)Nal-LR-aza-β ³ (1)Nal-NH ₂ | 19,12 min. | 21% |
| K-2Nal | H-ALSGKA-aza-β ³ (2)Nal-LR-aza-β ³ (2)Nal-NH ₂ | 20,56 min. | 55% |

Table 2. Antibacterial activities against Gram negative and Gram positive bacteria MIC (μM).

| | Cuttlefish peptide AD | Analogos of cuttlefish peptide | | | | Antibiotics |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------|--------|--------|-------------|
| | | AK | Aβ ³ K | K-1Nal | K-2Nal | Ampicillin |
| Gram positive | | | | | | |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 584 | 65 | na | 15 | 59 | 57 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | na* | na | nd* | >473 | >473 | 7 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | na | na | nd | 59 | 118 | 7 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | na | 262 | na | 15 | 30 | 14 |
| Gram negative | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 584 | 65 | na | 30 | 118 | 7 |
| <i>Salmonella thyphimurium</i> | na | 262 | na | 59 | 118 | 14 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | na | 524 | >517 | 118 | 237 | 916 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | na | >524 | na | na | >473 | 14 |
| <i>Vibrio harveyi</i> | >584 | 262 | na | 473 | 473 | >916 |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | 292 | 262 | na | >473 | >473 | >916 |
| <i>Vibrio aestuarianus</i> | 584 | 65 | nd | 59 | 59 | 7 |
| <i>Vibrio splendidus</i> | 292 | 33 | 259 | 237 | 517 | 29 |

* na : not active ; nd not determined

Table 3. Hemolysis activity of AK and K1Nal on rabbit erythrocytes.

| | Hemolysis % | |
|-----------|-------------|-------|
| | AK | K1Nal |
| 10 µg/ml | 1,37% | 0,00% |
| 40 µg/ml | 0,31% | 0,79% |
| 160 µg/ml | 1,44% | 0,31% |

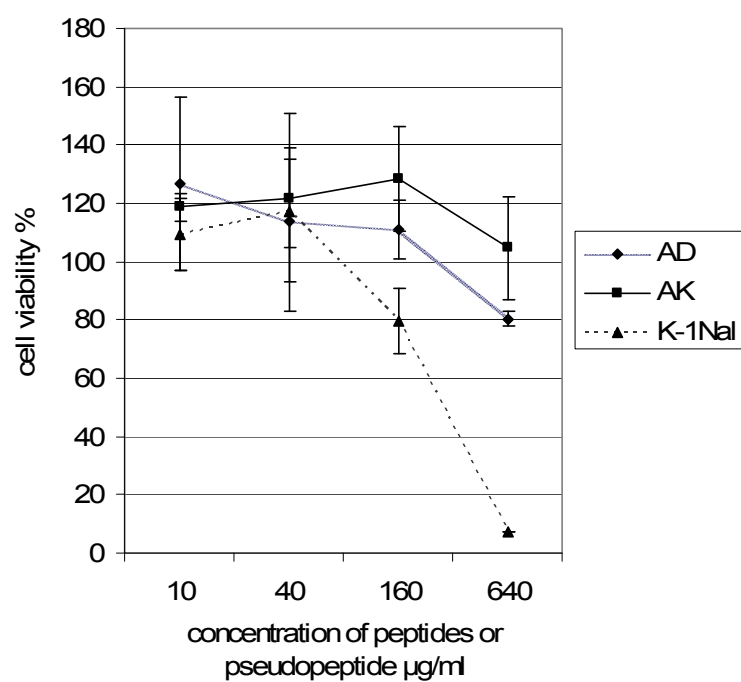
Figure 1. Cytotoxic activities of peptides and analogs on an Chinese Hamster Ovarian cell line (CHOK1).

Figure 2. CD spectra of peptides AD (A), AK (B) and pseudopeptides K1Nal (C), K2Nal (D), A β^3 K (E). Buffer: 10 mM Phosphate buffer, TFE: 50% TFE in buffer, SDS: 30 mM SDS in buffer.

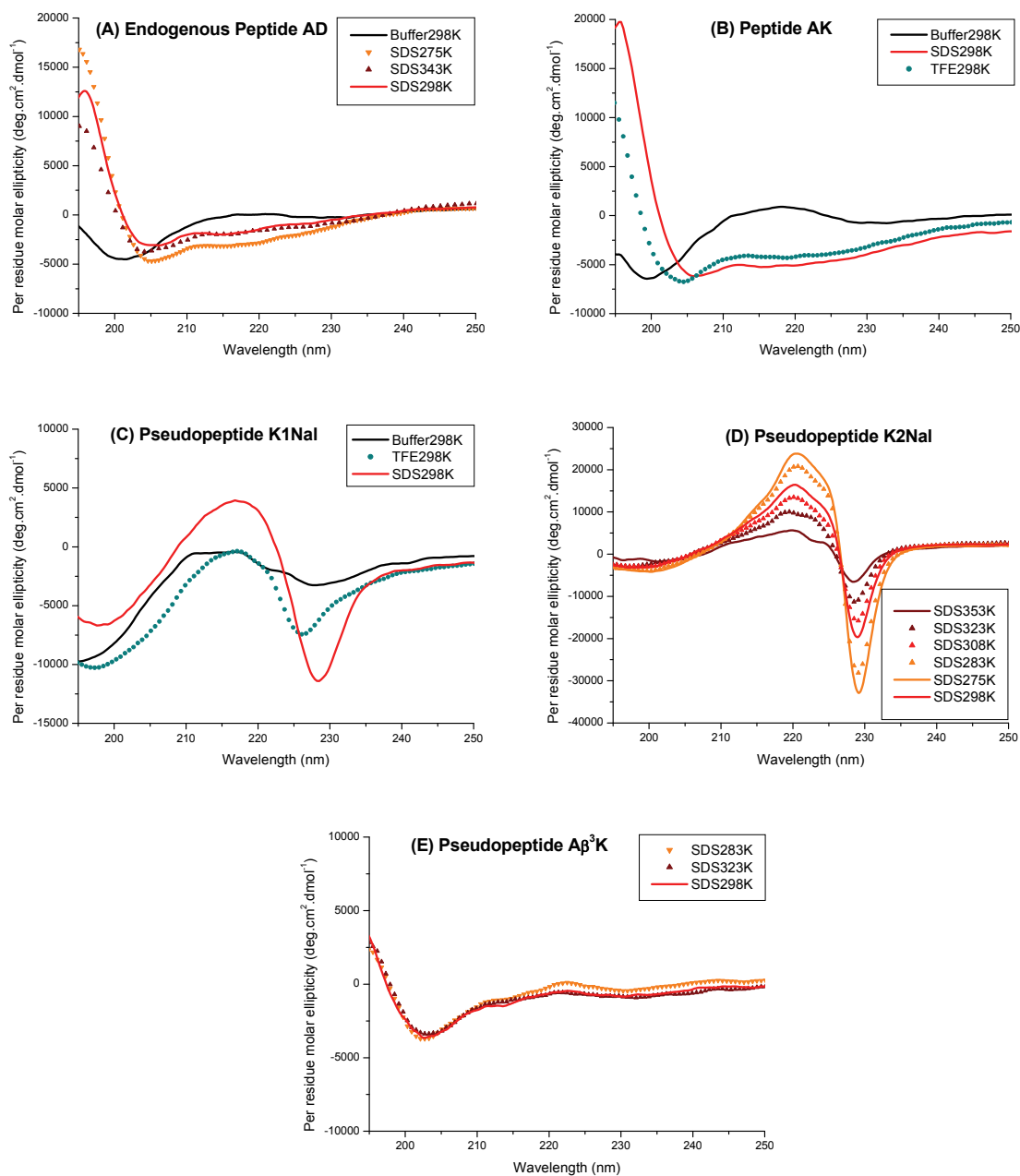


Table 4. Structural statistics for the 20 models of AD, AK and A β^3 K bound to SDS micelles.

| Peptides | AD | | AK | | Aβ ³ K | |
|---|----------------|-----------|----------------|----------------------------|-------------------|-----------|
| <u>Conformationnal restraints</u> | | | | | | |
| Total: | 147 | | 170 | | 213 | |
| Non ambiguous: | 78 | | 74 | | 119 | |
| Ambiguous: | 69 | | 96 | | 94 | |
| Dihedrals restraints (³ J _{HNHA}) | 5 | | 5 | | 3 | |
| <u>Restraints violations</u> | | | | | | |
| Distance restraints > 0,3 Å | 0 | | 0 | | 0 | |
| Dihedrals angle restraints > 5 Å | 0 | | 0 | | 0 | |
| <u>Energetics statistics (kcal.mol⁻¹)</u> | | | | | | |
| E _{tot} | -317.19 | | -263.66 | | -239.57 | |
| E _{vdw} | -64.80 | | -70.24 | | -70.16 | |
| E _{elec} | -324.53 | | -280.57 | | -238.42 | |
| E _{noe} | 8.23 | | 17.1 | | 9.03 | |
| <u>Ramachandran maps</u> | | | | | | |
| Residues in most favoured regions | 87.1% | | 76.4% | | 40.0% | |
| Residues in additional allowed regions | 12.9% | | 23.6% | | 60.0% | |
| Residues in generously allowed regions | 0% | | 0% | | 0% | |
| Residues in disallowed regions | 0% | | 0% | | 0% | |
| <u>Average RMSD (pairwise, Å)</u> | | | | | | |
| | Backbone atoms | All heavy | Backbone atoms | All heavy | Backbone | All heavy |
| Whole (1-10) | 1.312 | 1.591 | 1.395 | 2.109 | 1.362 | 2.043 |
| Region (5-10) | 0.163 | 0.809 | 0.328 | 1.182 | 0.384 | 0.975 |
| Whole (1-10) | | | | | Backbone | All heavy |
| | | | | “Bundle R” (15 structures) | 0.937 | 1.471 |
| | | | | “Bundle S” (5 structures) | 0.448 | 0.622 |

Figure 3. The 20 lowest energy structures with no violations > 0.3 Å from the 60 structures calculated in the final iteration of ARIA for neuropeptide analogs in SDS micelles. (A) AD, (B) AK, (C) The two set of structures of A β^3 K for the two possible configurations of the Aza- β^3 -lysine. The superposition was performed using the backbone atoms of residues 5-10. For clarity, the side chains of residues 1-4 are not drawn. The backbone of all structures is shown in black while the side chains of the Phe residues are displayed in red, the Asp or Lys residues in green, the Ala residues in orange, the Leu residues in purple, and the Arg residues in blue.

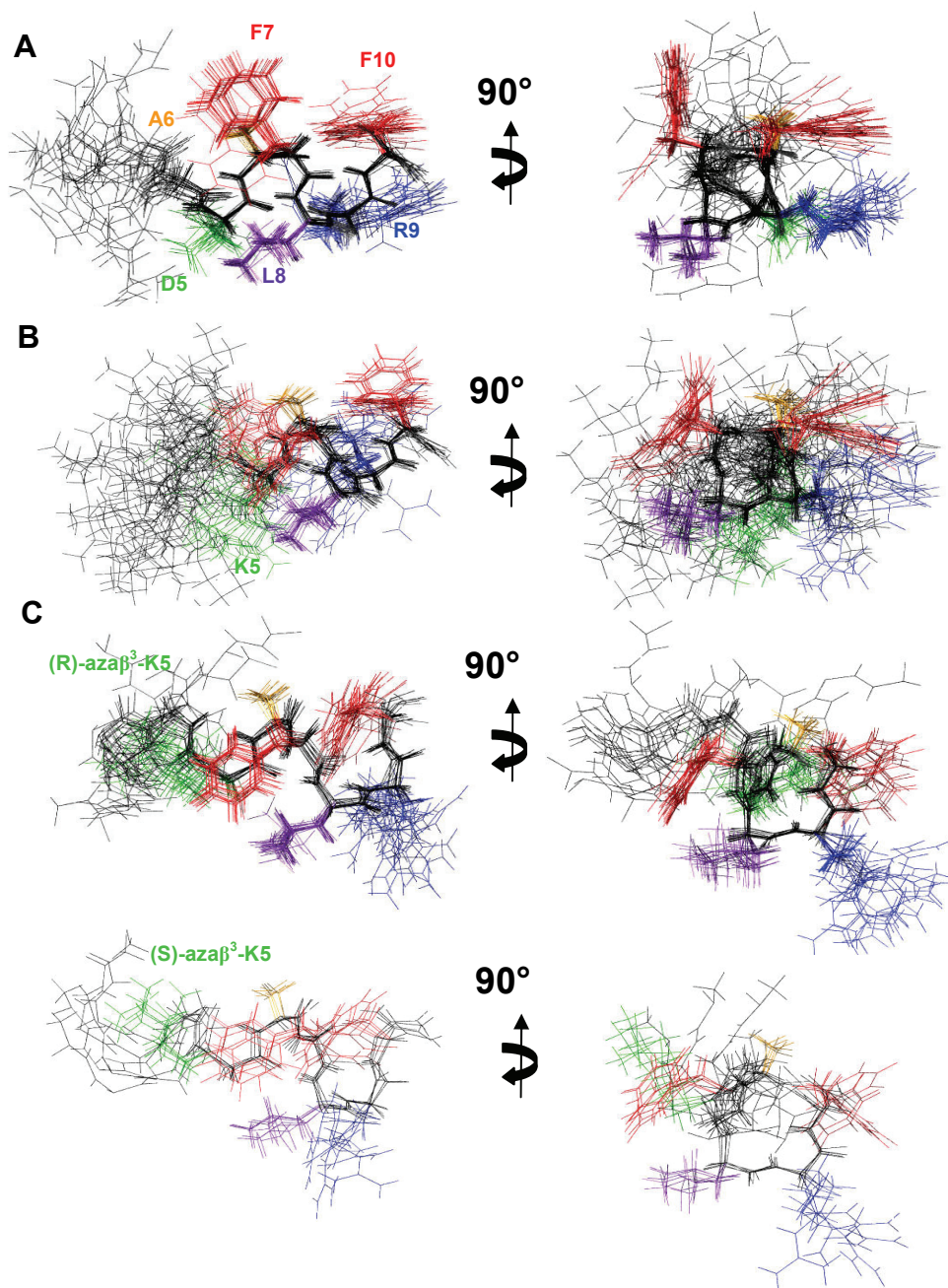


Figure 4. The 20 lowest energy structures of A β^3 K from the 60 structures calculated in the final iteration of ARIA. The two set of structures with (A) R- and (B) S-hydrazinoturn are fitted on the backbone atoms of the residues 1-10. (C) The structural features of the A β^3 K. The hydrazinoturn is displayed in green and the two γ -turn involving the residue 2-5 and 5-8, surrounding this N-N turn, are respectively shown in cyan and in magenta. Hydrogens bond are represented with dashed lines. (D) Distances and torsion angles in the hydrazinoturn.

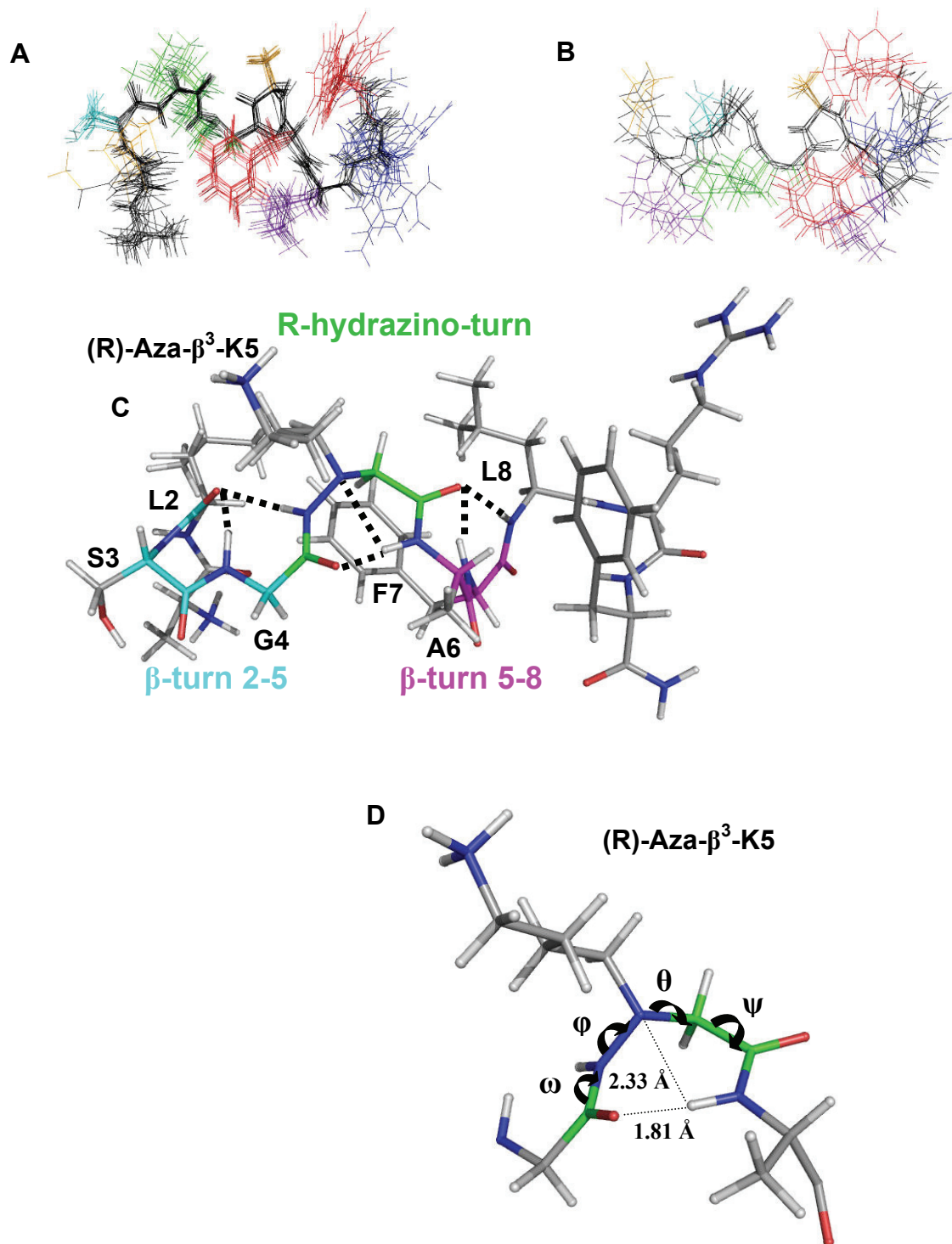


Table 5. (A) Average torsion angles of the (R)- and (S)-Hydrazinoturn and (B) of the β -turn 2-5 and 5-8 for the $A\beta^3K$ peptide.**A**

| Torsion angles (°) | ω | ϕ | θ | ψ |
|--------------------|----------|--------|----------|--------|
| (R)-hydrazinoturn | +179 | +111 | -95 | +30 |
| (S)-hydrazinoturn | +177 | -115 | +81 | -7 |

B

| Torsion angles (°) | ϕ_{i+1} | ψ_{i+1} | ϕ_{i+2} | ψ_{i+2} |
|--------------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| (R) $A\beta^3K$ β -turn 2-5 | -77 ± 3 | $+59 \pm 11$ | -147 ± 32 | -20 ± 17 |
| (R) $A\beta^3K$ β -turn 5-8 | -76 ± 6 | $+42 \pm 8$ | -142 ± 7 | -13 ± 10 |
| (S) $A\beta^3K$ β -turn 2-5 | -79 ± 6 | $+49 \pm 9$ | -141 ± 17 | 17 ± 17 |
| (S) $A\beta^3K$ β -turn 5-8 | -76 ± 2 | $+37 \pm 16$ | -147 ± 7 | -12 ± 16 |

3.3 Etude d'un pseudopeptide cyclique possédant des résidus aza- β^3 par RMN

Nous avons précédemment vu que certains octa- et hexapeptides cycliques possédaient des activités antimicrobiennes particulièrement intéressantes. Ghadiri et coll. (79) ont démontré que des peptides cycliques composés de lysines, de leucines et de tryptophanes, alternant les configurations L et D forment des nanotubes qui pourraient s'intégrer dans les membranes et conduire à la mort cellulaire. A l'inverse, des cyclohexapeptides antimicrobiens composés uniquement d'acides aminés L ne s'associent pas et ne s'enfouissent que partiellement dans des micelles lipidiques. M. Laurencin a synthétisé une gamme de cyclopseudopeptides, alternant acides aminés L et des résidus aza- β^3 . Ces analogues, portant leur chaîne latérale sur un atome d'azote dont la configuration n'est pas fixée, peuvent adopter une configuration R ou S *via* des interactions favorables ou lorsqu'ils subissent des contraintes stériques. Nous avons également vu que les aza- β^3 -peptides avaient plus de possibilités de former des liaisons hydrogènes que les acides aminés naturels. Aussi, ces pseudopeptides cycliques sont donc de bons candidats pour s'autoassembler, *via* des liaisons hydrogènes intermoléculaires, et présenter des activités antimicrobiennes. Ainsi, la synthèse de 31 résidus aza- β^3 a été mise au point pour construire un grand nombre de séquences sur la base des caractéristiques communes aux peptides antimicrobiens (principalement des résidus cationiques et hydrophobes). Six pseudopeptides de séquences très différentes ont tout d'abord été testés sur six souches bactériennes afin de caractériser le type de séquences qui présentent des activités antimicrobiennes. Ensuite, une seconde série de 14 peptides avec des séquences proches de la séquence du peptide le plus actif lors des premiers tests, ont subi de nombreuses mesures d'activités antimicrobiennes sur des bactéries, des levures, des champignons ainsi que des mesures de cytotoxicité sur des érythrocytes de lapin et des cellules CHO-K1.

Le peptide le plus actif, tout en gardant une sélectivité importante pour les microorganismes a été baptisé « NafNaf ». Il s'agit d'un pseudoheptapeptide cyclique alternant des résidus aza- β^3 et des acides aminés naturels comme le montre la Figure 66.

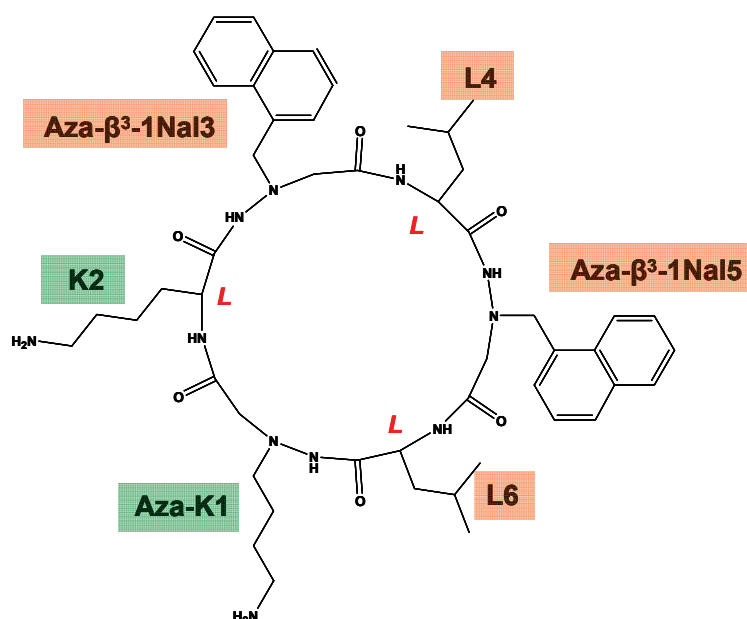


Figure 66 : Séquence du NafNaf. Les acides aminés chargés sont surlignés en vert et les résidus hydrophobes sont surlignés en brun.

Notre objectif est de faire une étude structurale du NafNaf par RMN en présence de différents modèles membranaires.

3.3.1 Les propriétés d'autoassociation du NafNaf

De par l'analogie entre ce peptide et les peptides cycliques de Ghadiri qui forment des nanotubes, nous avons tout d'abord vérifié si le NafNaf était capable de s'autoassocier. Nous avons donc commencé par faire un titrage du NafNaf par RMN dans l'eau et observé une variation du spectre RMN ^1H avec des concentrations croissantes en NafNaf. Les déplacements chimiques ne varient quasiment plus pour des concentrations inférieures à 1 mM et supérieures à 12 mM, avec une transition autour de 7 mM. Nous sommes donc en présence de deux formes en équilibre, une forme principalement monomérique à faible concentration et une forme auto-associée pour des concentrations supérieures à 7 mM. Pour des concentrations importantes, les spectres restent bien résolus, il est donc peu probable que le NafNaf forme des objets de tailles importantes comme le K4. Sur la Figure 67, on observe une faible variation des largeurs de raies ^1H avec l'ajout de NafNaf et toujours un seul jeu de signaux. On en déduit qu'un complexe symétrique ou en échange rapide est présent à ces concentrations. La transition vers 7 mM, de même que la stabilisation des variations de déplacements chimiques autour de 12 mM semble nous indiquer que cette auto-association

n'implique pas un grand nombre de monomères. Ce constat est en accord avec l'analyse des effets Overhauser homonucléaire, des études par mesure de diffusion et par DLS.

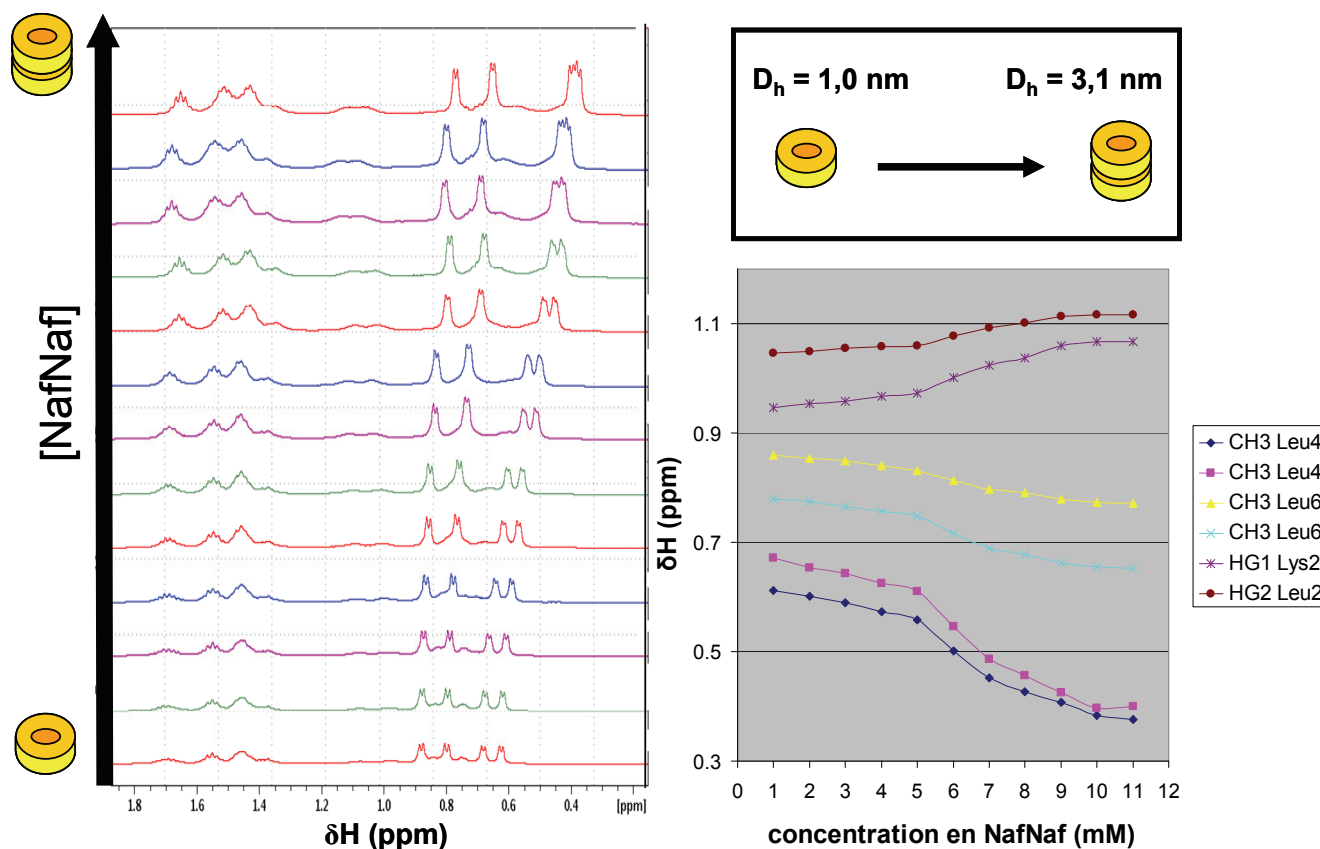


Figure 67: Variation du spectre RMN en présence de concentrations croissantes en NafNaf.

Des mesures du diamètre hydrodynamique D_h par diffusion de lumière (DLS) de ce cyclopeptide confirment l'autoassociation du NafNaf avec deux populations : une première correspondant au monomère avec un diamètre hydrodynamique de $1 \pm 0,2$ nm et une seconde correspondant à un oligomère de diamètre de $3,1 \pm 0,9$ nm. Nous avons ensuite construit la structure étendue du NafNaf avec CNS pour comparer les diamètres mesurés par DLS avec des diamètres « théoriques ». Le diamètre du peptide a été mesuré avec un logiciel de visualisation de structure, il est compris théoriquement entre 0,5 et 2 nm. Bien que la taille et le caractère cyclique du NafNaf limite le nombre de conformations qu'il peut adopter, cette mesure est particulièrement imprécise de par sa forme non sphérique. Néanmoins, nous avons pu vérifier que les diamètres obtenus par diffusion de lumière étaient bien cohérents avec la taille théorique du peptide. Il est cependant difficile, à partir de ces données, de déterminer le nombre de peptides qui s'autoassocient pour former un oligomère, cependant les complexes formés ont un diamètre bien trop faible pour que ces objets correspondent à des nanotubes dont les longueurs peuvent avoisiner plusieurs dizaines de nanomètres. De plus, ces

nanostructures n'ont pour le moment été observées que pour des cyclopeptides dont la séquence est le plus souvent symétrique et composé d'un seul type d'acide aminé ou de résidus non chargés. L'asymétrie de la séquence du NafNaf, avec une partie du cycle composée d'acides aminés chargés positivement, limite fortement son empilement de par les répulsions électrostatiques générées par l'aza- β^3 -lysine 1 et la lysine 2. On trouve quelques peptides dans la littérature, avec le même type de séquence, qui formeraient essentiellement des dimères. L'hypothèse la plus probable serait donc la formation de dimères de NafNaf en échange rapide. La présence d'un seul jeu de signaux sur les spectres RMN lorsque le NafNaf est associé, peut laisser présager également la formation d'un homodimère.

3.3.2 Etude structurale du NafNaf dans l'eau

Nous avons décidé d'aller plus loin dans l'analyse de cette oligomérisation et nous avons enregistré des spectres 2D COSY, TOCSY, NOESY, ^{13}C -HSQC et ^{13}C -HMBC pour déterminer les déplacements chimiques ^1H et faire une étude structurale du NafNaf. Néanmoins, la stratégie d'attribution séquentielle classique est compliquée par l'absence de proton H_α sur les résidus aza- β^3 . Lors des expériences TOCSY, il n'y a donc pas transfert de polarisation le long de la chaîne latérale de ces acides aminés. Il est cependant possible d'identifier rapidement les systèmes de spins des acides aminés aza- β^3 car le déplacement chimique de leurs protons amides est particulièrement déblindé entre 9 et 10 ppm. Une fois les acides aminés naturels attribués, on peut s'appuyer sur le spectre NOESY pour attribuer les résidus aza- β^3 . Toutefois, la difficulté d'attribution des aza- β^3 -peptides augmente proportionnellement avec le nombre de résidus aza- β^3 incorporés et leurs positions relatives dans la séquence.

Les résonances des chaînes latérales des résidus aza- β^3 -1-naphtylalanine sont peu dispersées et il est très difficile de les attribuer de manière non ambiguë. L'équipe de M. Baudy Floc'h a donc synthétisé un 5fluo-NafNaf avec un atome de fluor sur la chaîne latérale du résidu 5 afin d'éclater les résonances.

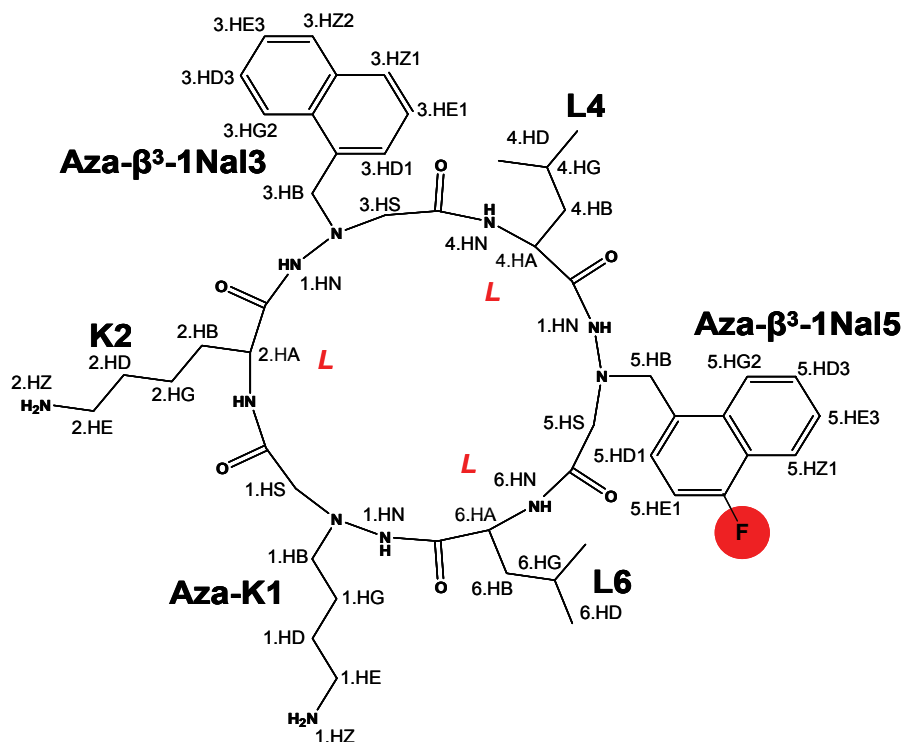


Figure 68 : Séquence du 5fluoNAFNAF avec la nomenclature IUPAC des protons.

Comme on peut le voir sur la Figure 69, nous obtenons une bonne dispersion des résonances des chaînes latérales des résidus aza- β^3 -1Nal3 et aza- β^3 -1Nal5. Il nous est maintenant possible d'attribuer toutes les résonances ^1H de ce pseudopeptide. Les tables de déplacements chimiques sont présentées dans la partie suivante.

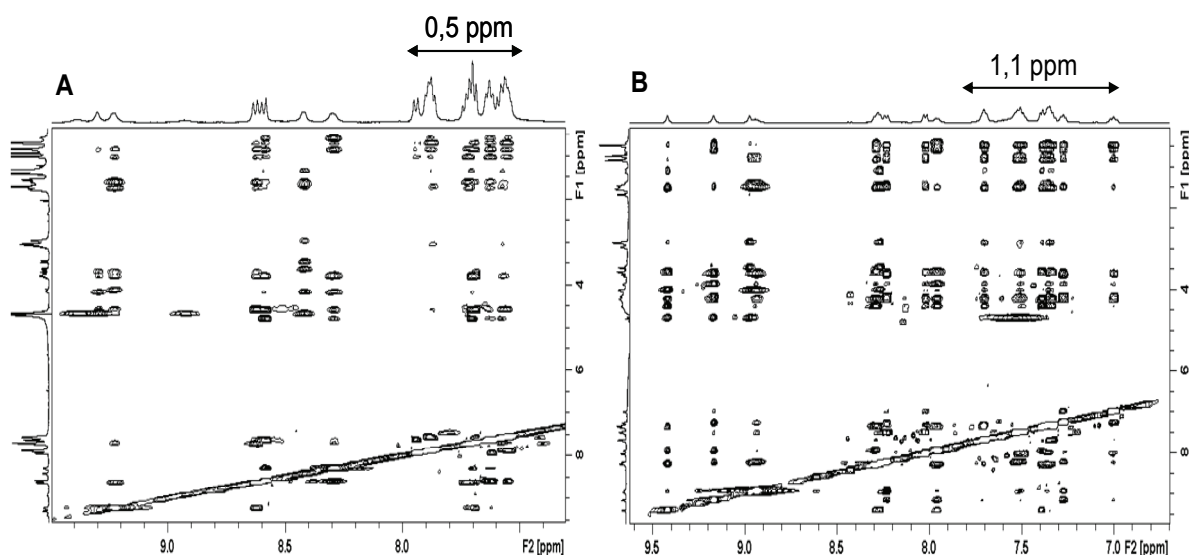


Figure 69 : Portion des spectres NOESY de l'oligomère de (A) NafNaf et (B) 5fluoNafNaf.

Les spectres 2D NOESY du monomère ont des pics NOE positifs très faibles à 293K tandis que les spectres du complexe ont des pics NOE négatifs assez intenses. Nous sommes

donc dans des conditions où peu d'informations spatiales seront utilisables, nous avons donc décidé de ne pas essayer de déterminer la structure du monomère de NafNaf dans l'eau.

On peut mettre en évidence sur les spectres 2D NOESY de l'oligomère de 5fluo-NafNaf quelques pics NOE intermoléculaires. Ces pics sont identifiables en analysant la structure étendue et en modélisant un monomère à partir des contraintes de distance de l'oligomère. On observe alors des violations sur un set de pics NOE à priori correctement attribué qui correspondent à des pics NOE intermoléculaires. Il est probable que certaines contraintes de distances intermoléculaires puissent être satisfaites même en étant considérées comme des contraintes intramoléculaires étant donné la taille réduite de notre peptide.

La difficulté de la modélisation de ce peptide dans l'eau provient essentiellement des incertitudes sur son état d'oligomérisation. Nous avons vu précédemment qu'il y a de fortes probabilités que la NafNaf soit sous forme d'un homodimère à haute concentration, nous avons donc commencé à modéliser le NafNaf dans cet état d'oligomérisation en analysant soigneusement chaque violation.

3.3.3 Etude structurale du NafNaf en présence de modèles membranaires

Sur des clichés de microscopie électronique (MET) de la bactérie *S. aureus* en présence de NafNaf, M. Laurencin a observé des débris cellulaires, de parois dans le milieu, des bactéries déformées dont la membrane était altérée ou avec une absence de contenu cytoplasmique. Le NafNaf semble donc inhiber la croissance bactérienne en désorganisant la membrane bactérienne. Afin de proposer un mode d'action pour ce cyclopeptide, nous avons donc étudié par RMN le NafNaf en présence de plusieurs types de modèles membranaires : des micelles de SDS, de DPC et des SUV anioniques.

3.3.3.1 Etude du NafNaf en présence de micelles de détergents

Nous avons enregistré des spectres dans des conditions de température et de pH similaires pour déterminer les protons dont les déplacements chimiques sont les plus perturbés par l'autoassociation ou l'interaction avec les micelles de SDS et de DPC. Les spectres ont été calibrés avec du TSP et les résultats sont reportés dans la Table 2.

| | NafNaf 1 mM | NafNaf 12 mM | $\Delta\delta$ dimere | NafNaf 1mM+DPC | $\Delta\delta$ DPC | NafNaf 1mM+SDS | $\Delta\delta$ SDS |
|----------|----------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| AZK1.HN | 9.00 | 8.97 | -0.03 | 9.00 | 0.00 | 8.87 | -0.13 |
| AZK1.HB1 | | | | | | | |
| AZK1.HB2 | | | | | | | |
| AZK1.QB | 2.85 | 2.84 | -0.01 | 2.89 | 0.04 | 2.88 | 0.03 |
| AZK1.HG1 | 1.38 | | | | | | |
| AZK1.HG2 | 1.49 | | | | | | |
| AZK1.QG | | 1.45 | 0.01 | 1.46 | 0.02 | 1.49 | 0.05 |
| AZK1.HD1 | | | | | | | |
| AZK1.HD2 | | | | | | | |
| AZK1.QD | 1.72 | 1.68 | -0.04 | 1.69 | -0.03 | 1.69 | -0.03 |
| AZK1.HE1 | | | | | | | |
| AZK1.HE2 | | | | | | | |
| AZK1.QE | 2.97 | 2.96 | -0.01 | 2.97 | 0.00 | 2.98 | 0.01 |
| AZK1.HS1 | 3.29 | | 0.18 | 3.41 | 0.12 | 3.39 | 0.10 |
| AZK1.HS2 | 3.48 | | -0.01 | 3.58 | 0.10 | 3.57 | 0.09 |
| AZK1.QS | | 3.47 | | | | | |
| LYS2.HN | 8.27 | 8.27 | 0.00 | 8.33 | 0.06 | 8.34 | 0.07 |
| LYS2.HA | 4.02 | 4.02 | 0.00 | 4.05 | 0.03 | 4.07 | 0.05 |
| LYS2.HB1 | | | | | | | |
| LYS2.HB2 | | | | | | | |
| LYS2.QB | 1.45 | 1.52 | 0.07 | 1.62 | 0.17 | 1.55 | 0.10 |
| LYS2.HG1 | 0.99 | 1.06 | 0.07 | | | | |
| LYS2.HG2 | 1.09 | 1.13 | 0.04 | | | | |
| LYS2.QG | | | | 1.31 | 0.27 | 1.26 | 0.22 |
| LYS2.HD1 | | | | | | | |
| LYS2.HD2 | | | | | | | |
| LYS2.QD | 1.56 | 1.51 | -0.05 | 1.67 | 0.11 | 1.62 | 0.06 |
| LYS2.HE1 | | | | | | | |
| LYS2.HE2 | | | | | | | |
| LYS2.QE | 2.89 | 2.86 | -0.03 | 2.92 | 0.03 | 2.96 | 0.07 |
| NAF3.HN | 9.49 | 9.42 | -0.07 | 9.51 | 0.02 | 9.31 | -0.18 |
| NAF3.HB1 | 4.45 | 4.23 | -0.22 | | | | |
| NAF3.HB2 | 4.55 | 4.42 | -0.13 | | | | |
| NAF3.QB | | | | 4.44 | -0.06 | 4.50 | 0.00 |
| NAF3.HD1 | 7.51 | 7.32 | -0.19 | 7.65 | 0.14 | 7.61 | 0.10 |
| NAF3.HE1 | 7.96 | 7.69 | -0.27 | 7.47 | -0.49 | 7.47 | -0.49 |
| NAF3.HZ1 | 7.51 | 7.39 | -0.12 | 7.77 | 0.26 | 7.78 | 0.27 |
| NAF3.HG2 | 8.43 | 8.29 | -0.14 | 8.63 | 0.20 | 8.49 | 0.06 |
| NAF3.HD3 | 7.63 | 7.35 | -0.28 | 7.57 | -0.06 | 7.49 | -0.14 |
| NAF3.HE3 | 7.60 | 7.36 | -0.24 | 7.46 | -0.14 | 7.50 | -0.10 |
| NAF3.HZ2 | 8.00 | 7.70 | -0.30 | 7.79 | -0.21 | 7.80 | -0.20 |
| NAF3.HS1 | 3.68 | | | | | 3.66 | -0.02 |
| NAF3.HS2 | 3.74 | | | | | 3.74 | 0.00 |
| NAF3.QS | | 3.57 | -0.14 | 3.64 | -0.07 | | |
| LEU4.HN | 8.09 | 7.96 | -0.13 | 8.30 | 0.21 | 8.18 | 0.09 |
| LEU4.HA | 3.95 | 3.87 | -0.08 | 4.08 | 0.13 | 4.05 | 0.10 |
| LEU4.HB1 | | 0.40 | | 0.54 | | | |
| LEU4.HB2 | | 0.61 | | 0.80 | | | |
| LEU4.QB | 0.80 | | -0.30 | | -0.13 | 0.32 | -0.48 |
| LEU4.HG | 0.72 | 0.55 | -0.17 | 0.77 | 0.05 | 0.62 | -0.10 |

| | | | | | | | |
|----------|------|------|-------|------|-------|------|-------|
| LEU4.QD1 | 0.63 | | | 0.58 | -0.05 | 0.58 | -0.05 |
| LEU4.QQD | | 0.47 | -0.19 | | | | |
| LEU4.QD2 | 0.69 | | | 0.60 | -0.09 | 0.60 | -0.09 |
| NAF5.HN | 9.29 | 9.17 | -0.12 | 9.76 | 0.47 | 9.20 | -0.09 |
| NAF5.HB1 | 4.37 | 4.17 | -0.20 | | | | |
| NAF5.HB2 | 4.53 | 4.24 | -0.29 | | | | |
| NAF5.QB | | | | 4.46 | 0.01 | 4.47 | 0.02 |
| NAF5.HD1 | 7.46 | 7.27 | -0.19 | 7.63 | 0.17 | 7.58 | 0.12 |
| NAF5.HE1 | 7.24 | 7.00 | -0.24 | 7.18 | -0.06 | 7.16 | -0.08 |
| NAF5.HG2 | 8.40 | 8.23 | -0.17 | 8.61 | 0.21 | 8.57 | 0.17 |
| NAF5.HD3 | 7.72 | 7.52 | -0.20 | 7.70 | -0.02 | 7.71 | -0.01 |
| NAF5.HE3 | 7.73 | 7.49 | -0.24 | 7.59 | -0.14 | 7.63 | -0.10 |
| NAF5.HZ2 | 8.23 | 8.02 | -0.21 | 8.12 | -0.11 | 8.17 | -0.06 |
| NAF5.HS1 | 3.61 | 3.58 | -0.03 | | | 3.63 | 0.02 |
| NAF5.HS2 | 3.82 | 3.65 | -0.17 | | | 3.75 | -0.07 |
| NAF5.QS | | | | 3.68 | -0.03 | | |
| LEU6.HN | 8.83 | 8.94 | 0.11 | 9.29 | 0.46 | 9.23 | 0.40 |
| LEU6.HA | 4.05 | 4.04 | -0.01 | 3.96 | -0.09 | 4.08 | 0.03 |
| LEU6.HB1 | 1.39 | 1.39 | 0.00 | 1.54 | 0.15 | 1.55 | 0.16 |
| LEU6.HB2 | 1.46 | 1.55 | 0.09 | 1.90 | 0.44 | 1.79 | 0.33 |
| LEU6.QB | | | | | | | |
| LEU6.HG | 1.48 | 1.47 | -0.01 | 1.66 | 0.18 | 1.63 | 0.15 |
| LEU6.QD1 | 0.83 | 0.74 | -0.09 | 0.71 | -0.12 | 0.79 | -0.04 |
| LEU6.QD2 | 0.89 | 0.84 | -0.05 | 0.96 | 0.07 | 0.98 | 0.09 |

Table 2 : Variation des déplacements chimiques δH du 5fluoNafNaf sous forme d'oligomère, en présence de micelles de détergents anioniques (50 mM SDS) et zwitterioniques (50 mM DPC), 293K pH 5. Les protons d'un méthylène sont nommés QX lorsqu'ils sont équivalents. $\Delta\delta H > 0,1$ ppm; $0,2$ ppm $<\Delta\delta H < 0,1$ ppm; $0,3$ ppm $<\Delta\delta H < 0,4$ ppm; $\Delta\delta H > 0,4$ ppm.

On remarque que les protons dont les déplacements chimiques sont les plus affectés par l'autoassociation du NafNaf ou l'enfouissement dans des micelles de détergents appartiennent essentiellement aux résidus hydrophobes. On en déduit que le NafNaf s'autoassocie dans l'eau via des interactions hydrophobes impliquant principalement les deux résidus aza- β^3 -naphtylalanines et la leucine 4. Ensuite, on remarque que les déplacements chimiques du NafNaf lié aux micelles de SDS et DPC sont similaires, par conséquent le NafNaf a un comportement comparable en présence de micelles indépendant de leurs charges. Cette observation tranche avec le comportement du K4 dont la structure hélicoïdale est stabilisée en présence de micelles anioniques.

On observe globalement, une analogie entre les déplacements chimiques affectés lors de l'oligomérisation du NafNaf et lors de l'interaction du monomère avec les micelles. Il est possible que le NafNaf s'autoassocie à de faibles concentrations dans un environnement hydrophobe. Cependant, on remarque des modifications importantes pour les déplacements chimiques des protons HN et HB de la leucine 6 à la fois pour les micelles de SDS et les micelles de DPC tandis que ce résidu n'est pas affecté par l'autoassociation du NafNaf. Il est

donc probable que le comportement du NafNaf pour des fortes concentrations ou en présence de micelles soit différent sans exclure la possibilité d'un autoassemblage d'une autre nature pour des faibles concentrations en micelles.

Les pics NOE n'ont pas encore été attribués, on ne peut donc pas encore statuer sur la présence de pic NOE intermoléculaires soutenant l'hypothèse de cette association en milieu hydrophobe.

3.3.3.2 Etude du NafNaf en présence de SUV anionique

Le NafNaf a ensuite été étudié en présence de petits liposomes unilamellaires composés de DOPC:DOPS avec un rapport de 2:1. Les SUV sont plus biomimétiques que les détergents pour mimer les membranes bactériennes. Le rayon hydrodynamique des SUV a été vérifié par DLS, il est d'environ 70 nm. Le déplacement chimique et la finesse des pics des lipides des SUV permettent également de contrôler l'intégrité et le diamètre de ces SUV. Les lipides ne sont pas deutérés et il est nécessaire de les supprimer par une série d'irradiations sélectives pour observer les signaux du peptide en association.

Nous avons d'abord titré le peptide avec des SUV, pour vérifier que le peptide interagit avec ce modèle membranaire et déterminer la concentration de lipides pour laquelle il n'y a plus de variation de déplacement chimique des protons du peptide, ce qui traduit une complexation complète des peptides avec les SUV. On remarque sur la Figure 70, que les largeurs de raie du NafNaf libre s'élargissent dans un premier temps, avec l'ajout de SUV dû à l'échange entre l'état libre et l'état lié du peptide. Le spectre rose montre de nombreux signaux proches de la coalescence, dans ces conditions, il y a presque autant de peptides liés que de peptides libres. Lorsque l'on continue à ajouter des SUV, les signaux s'affinent et se rapprochent des valeurs de déplacement chimique du peptide totalement lié.

Les largeurs de raies du NafNaf en interaction avec les SUV sont particulièrement fines. Une constante cinétique de dissociation k_{off} assez élevée a déjà été proposé comme capable de moyennner le couplage dipolaire et d'obtenir ainsi une bonne visibilité des signaux (152).

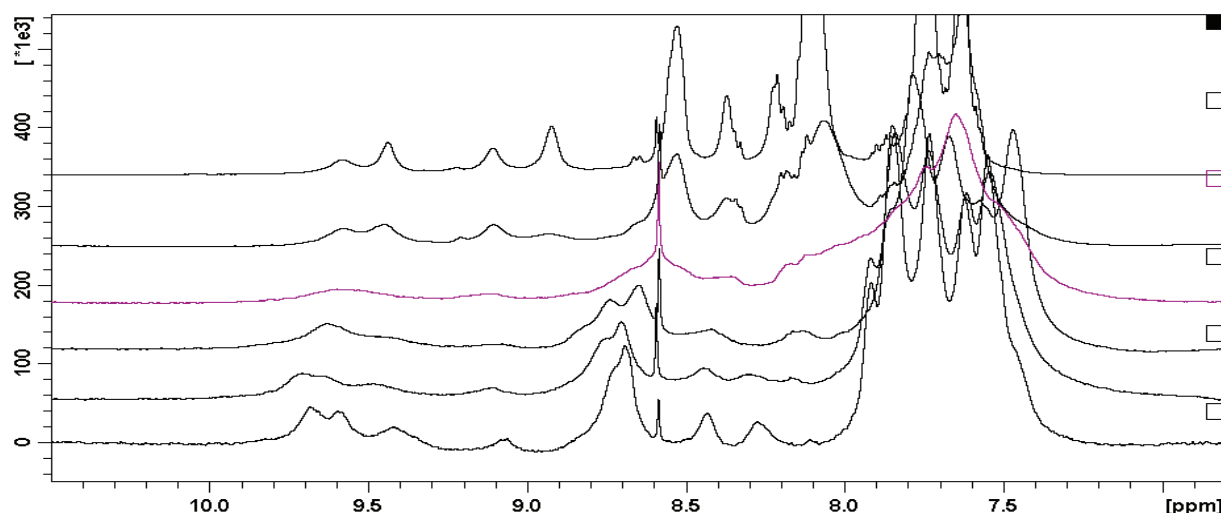


Figure 70 : Spectres 1D ^1H du 5fluoNafNaf en présence de concentration croissantes de SUV.

On peut observer sur la Figure 71, les spectres 1D ^1H et 2D NOESY du NafNaf en présence de micelles de SDS et en présence de SUV. Les pics intenses et larges dans la partie aliphatique du spectre correspondent aux signaux des lipides des SUV.

Sur les spectres 1D, on note que les largeurs de raies du peptide lié aux SUV sont plus larges que les raies du peptide en présence de SDS. Néanmoins, on conserve une visibilité assez bonne des signaux en SUV. On remarque également une certaine ressemblance des spectres du NafNaf en présence des deux modèles membranaires, qui laissent penser que le comportement du peptide enfoui dans une micelle ou en association avec une bicouche lipidique sont comparables. Cette analogie dans les valeurs de déplacements chimiques du peptide nous est utile pour attribuer les déplacements chimiques du NafNaf en présence de SUV. En effet, l'association du peptide avec les SUV diminue drastiquement les temps de relaxation (T_2 et $T_{1\rho}$) des spins et nous n'observons aucun signaux sur les spectres COSY et TOCSY. Par conséquent, aucun couplage scalaire n'est observable pour déterminer l'attribution séquentielle du peptide en présence de NafNaf.

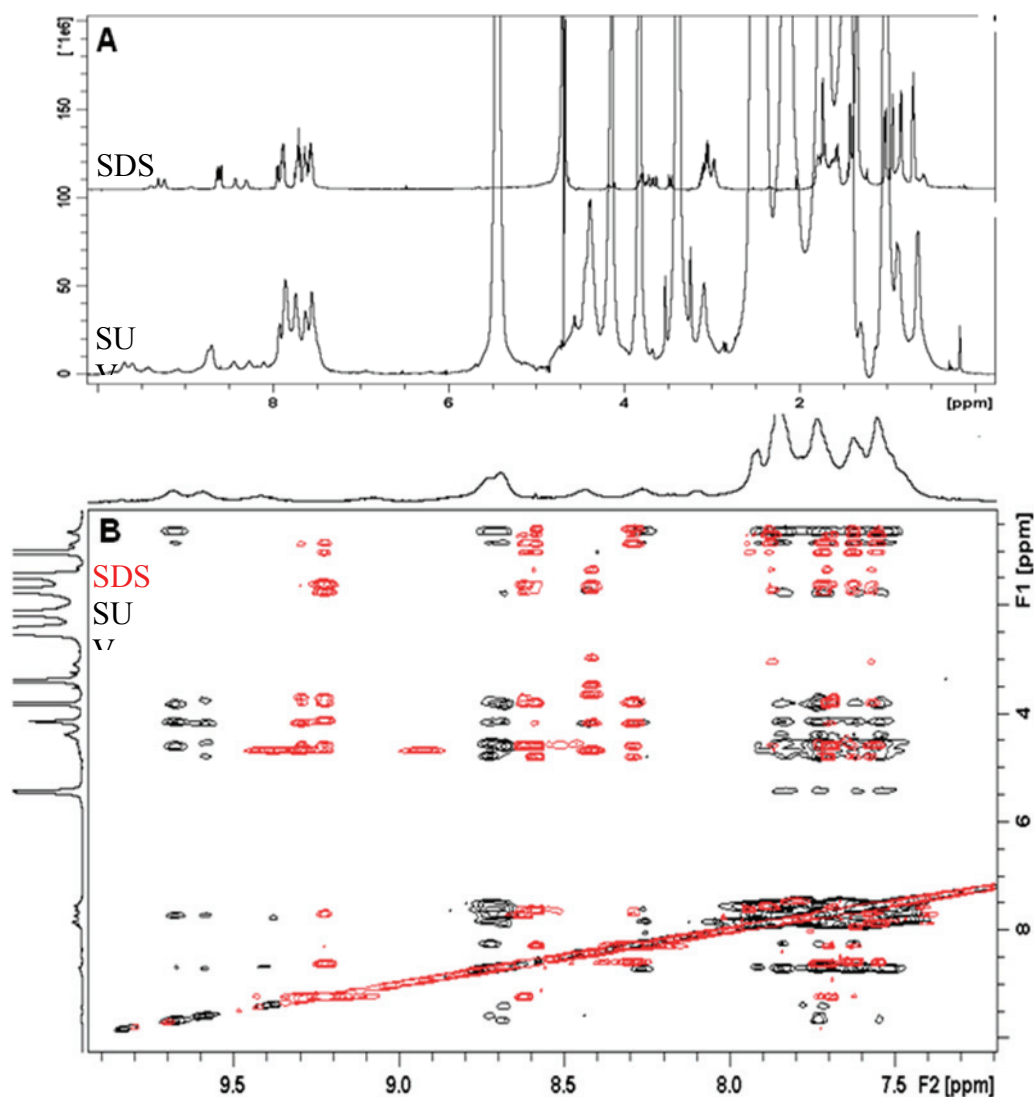


Figure 71 : Comparaison des spectres du 5fluoNafNaf en présence de SDS et de SUV.

Une autre difficulté dans l'étude structurale du NafNaf en présence de SUV est que les signaux des lipides masquent complètement les autres signaux dans la partie aliphatique des spectres RMN. Par conséquent, on ne possèdera aucune contrainte de distances entre les chaînes latérales pour calculer des modèles de ce peptide par RMN. Cette perte d'information risque de poser de sérieux problèmes pour converger vers une structure majoritaire lors de la modélisation. Même s'ils sont relativement onéreux, il sera cependant possible d'utiliser des lipides deutérés qui permettraient de récupérer une partie des signaux des chaînes latérales.

3.3.3.3 Conclusions et perspectives

Les déplacements chimiques du NafNaf ont été déterminés dans différents milieux, l'objectif est donc maintenant de déterminer les structures de ce pseudopeptide et de le positionner dans les micelles de détergents et dans la bicouche lipidique.

La modélisation peut être effectuée avec la même stratégie que celle utilisée pour déterminer la structure des aza- β^3 -peptides linéaires dérivés du neuropeptide de seiche. Quelques modifications supplémentaires ont été apportées dans le protocole d'ARIA pour prendre en compte les contraintes dû à la cyclisation du peptide. Ces adaptations sont détaillées dans l'annexe 3. Il sera probablement nécessaire d'enregistrer des spectres en présence de SUV composé de lipides deutérés pour obtenir des informations spatiales entre les chaînes latérales des résidus. (Publi Le Grel, blocage de la conformation des aza)

Des études avec un agent paramagnétique shiftant, l'ion Pr^{3+} , ont été enregistrées pour obtenir des informations sur la position du NafNaf dans la micelle et lors de son association avec les SUV. Les spectres ont été calibrés avec du TSP en sonde externe, ils n'ont pas encore été analysés.

4. Pseudopeptides antimicrobiens : conclusions et perspectives

Nous avons étudié trois exemples de peptides qui à l'exception du neuropeptide AD ont été synthétisés *de novo* en se basant sur les caractéristiques communes des peptides antimicrobiens naturels. Ils ont tous une charge nette positive : +4 pour le K4, +2 pour les peptides dérivés du neuropeptide AD et le NafNaf, et sont composés d'au moins 50% de résidus hydrophobes. Ces peptides ont une structure tridimensionnelle amphiphile, avec une ségrégation spatiale entre leurs résidus hydrophobes qui leur permet d'interagir avec les membranes. L'importance de la charge nette, de l'hydrophobie et de l'amphiphilie pour l'activité antimicrobienne des peptides ont été démontrées lors de la série de substitution de résidus dans la seconde partie. On observe que les peptides antimicrobiens peuvent former des autoassemblages comme le K4 et le NafNaf. S'il est possible de déterminer la taille et la concentration à partir de laquelle sont formées ces auto-associations, il est difficile d'obtenir des informations expérimentales sur la structure atomique de ces complexes.

De nombreux types de pseudopeptides ont été synthétisés, afin d'augmenter la biodisponibilité des molécules actives en augmentant leur résistance aux protéases. Nous avons déterminé par RMN, les premières structures de peptides incorporant des résidus aza- β^3 en utilisant CNS/ARIA. Elles nous ont permis d'observer l'impact de l'incorporation de résidus aza- β^3 sur la conformation des peptides naturels et de confirmer la présence en solution d'*hydrazinoturn* précédemment observé dans des cristaux d'aza- β^3 -peptides. Les informations structurales, de plus en plus nombreuses, permettent de décrire les conformations que peuvent adopter ces pseudopeptides. L'utilisation des résidus aza- β^3 dans des séquences peptidiques pour développer des molécules antimicrobiennes et anticancéreuses offre de nombreuses possibilités encore peu exploitées.

Les SUV sont un modèle membranaire peu utilisé pour l'étude de l'interaction des molécules avec les lipides par RMN. Des études menées au laboratoire ont démontré que la visibilité des signaux des molécules associés était conditionnée par leur dynamique dans la bicouche et par la cinétique de l'interaction molécules-SUV. La visibilité est donc fonction des propriétés intrinsèques des peptides (taille, charge, conformation etc.) mais également de la composition lipidique des SUV dont dépend la charge et la fluidité membranaire. Pour la première fois au laboratoire, nous avons étudié des peptides antimicrobiens en présence de SUV. Un grand nombre de peptides en interaction ont des spectres RMN avec des largeurs de raie importantes et sont difficilement exploitables. Seuls les spectres 1D ^1H RMN du NafNaf présentent des raies suffisamment fines pour espérer enregistrer des spectres 2D de qualité acceptable. Cependant si les spectres 2D NOESY sont de bonne qualité, il n'y a quasiment aucun pic de corrélation sur les spectres COSY et TOCSY lorsque l'on utilise des séquences classiques.

Bibliographie

1. Andreu, D., and Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview, *Biopolymers* 47, 415-433.
2. Hancock, R. E., and Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends Microbiol* 8, 402-410.
3. Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., and Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function, *Dev Comp Immunol* 23, 329-344.
4. Tincu, J. A., and Taylor, S. W. (2004) Antimicrobial peptides from marine invertebrates, *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3645-3654.
5. Bulet, P., Stocklin, R., and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates, *Immunol Rev* 198, 169-184.
6. Yang, D., Chertov, O., and Oppenheim, J. J. (2001) The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity, *Cell Mol Life Sci* 58, 978-989.
7. Simmaco, M., Mignogna, G., and Barra, D. (1998) Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?, *Biopolymers* 47, 435-450.
8. Noga, E. J., and Silphaduang, U. (2003) Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish, *Drug News Perspect* 16, 87-92.
9. Sugiarto, H., and Yu, P. L. (2004) Avian antimicrobial peptides: the defense role of beta-defensins, *Biochem Biophys Res Commun* 323, 721-727.
10. Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., and Rodriguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defense peptides, *Biopolymers* 47, 479-491.
11. Chugh, J. K., and Wallace, B. A. (2001) Peptaibols: models for ion channels, *Biochem Soc Trans* 29, 565-570.
12. Willey, J. M., and van der Donk, W. A. (2007) Lantibiotics: peptides of diverse structure and function, *Annu Rev Microbiol* 61, 477-501.
13. Gifford, J. L., Hunter, H. N., and Vogel, H. J. (2005) Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties, *Cell Mol Life Sci* 62, 2588-2598.
14. Braly, J. P. (Septembre 2009) Soigner grâce aux peptides: entretien avec Robert Zimmer, *Journal du CNRS*, p 236.
15. Walsh, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance, *Nature* 406, 775-781.
16. Wang, Z., and Wang, G. (2004) APD: the Antimicrobial Peptide Database, *Nucleic Acids Res* 32, D590-592.
17. Laurencin, M. (2008) Peptides et pseudopeptides auto-assembleurs à activité antimicrobienne, *Thèse de l'université de Rennes 1*.
18. Kiss, G., and Michl, H. (1962) On the venomous skin secretion of the orange speckled frog *Bombina variegata*., *Toxicon* 1, 33-39.
19. Csordas, A., and Michl, H. (1969) Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L, *Toxicon* 7, 103-108.
20. Habermann, E., and Jentsch, J. (1967) Sequence analysis of melittin from tryptic and peptic degradation products, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 37-50.
21. Knoppel, E., Eisenberg, D., and Wickner, W. (1979) Interactions of melittin, a preprotein model, with detergents, *Biochemistry* 18, 4177-4181.
22. Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., and Boman, H. G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity, *Nature* 292, 246-248.
23. Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5449-5453.

24. Mor, A., and Nicolas, P. (1994) Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin, *Eur J Biochem* 219, 145-154.
25. Charpentier, S., Amiche, M., Mester, J., Vouille, V., Le Caer, J. P., Nicolas, P., and Delfour, A. (1998) Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics, *J Biol Chem* 273, 14690-14697.
26. Fehlbauer, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briand, J. P., Roussel, J. P., Letellier, L., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (1996) Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1221-1225.
27. Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M., and Gennaro, R. (1988) Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils, *J Biol Chem* 263, 9573-9575.
28. Silva, P. I., Jr., Daffre, S., and Bulet, P. (2000) Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family, *J Biol Chem* 275, 33464-33470.
29. Kokryakov, V. N., Harwig, S. S., Panyutich, E. A., Shevchenko, A. A., Aleshina, G. M., Shamova, O. V., Korneva, H. A., and Lehrer, R. I. (1993) Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins, *FEBS Lett* 327, 231-236.
30. Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., and Lehrer, R. I. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils, *J Clin Invest* 76, 1427-1435.
31. Dimarcq, J. L., Bulet, P., Hetru, C., and Hoffmann, J. (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates, *Biopolymers* 47, 465-477.
32. Michaut, L., Fehlbauer, P., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Reichhart, J. M., and Bulet, P. (1996) Determination of the disulfide array of the first inducible antifungal peptide from insects: drosomycin from *Drosophila melanogaster*, *FEBS Lett* 395, 6-10.
33. Lawyer, C., Pai, S., Watabe, M., Borgia, P., Mashimo, T., Eagleton, L., and Watabe, K. (1996) Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides, *FEBS Lett* 390, 95-98.
34. Harwig, S. S., Kokryakov, V. N., Swiderek, K. M., Aleshina, G. M., Zhao, C., and Lehrer, R. I. (1995) Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes, *FEBS Lett* 362, 65-69.
35. Agerberth, B., Lee, J. Y., Bergman, T., Carlquist, M., Boman, H. G., Mutt, V., and Jornvall, H. (1991) Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides, *Eur J Biochem* 202, 849-854.
36. Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W., and Cullor, J. S. (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils, *J Biol Chem* 267, 4292-4295.
37. Frank, R. W., Gennaro, R., Schneider, K., Przybylski, M., and Romeo, D. (1990) Amino acid sequences of two proline-rich bactericins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils, *J Biol Chem* 265, 18871-18874.
38. Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offner, G. D., and Troxler, R. F. (1988) Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*, *J Biol Chem* 263, 7472-7477.

39. Helmerhorst, E. J., van't Hof, W., Breeuwer, P., Veerman, E. C., Abee, T., Troxler, R. F., Amerongen, A. V., and Oppenheim, F. G. (2001) Characterization of histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane integrity excludes a candidacidal mechanism of pore formation, *J Biol Chem* 276, 5643-5649.
40. Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., and van der Donk, W. A. (2005) Biosynthesis and mode of action of lantibiotics, *Chem Rev* 105, 633-684.
41. Rogers, L. A. (1928) The Inhibiting Effect of Streptococcus Lactis on Lactobacillus Bulgaricus, *J Bacteriol* 16, 321-325.
42. Dimick K.P., Alderton G., Lewis J.C., Lightbody H.D., and H.L., F. (1947) Purification and some properties of subtilin., *Arch. Biochem.* 15, 1-11.
43. Kellner, R., Jung, G., Horner, T., Zahner, H., Schnell, N., Entian, K. D., and Gotz, F. (1988) Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic, *Eur J Biochem* 177, 53-59.
44. Whitmore, L., Chugh, J. K., Snook, C. F., and Wallace, B. A. (2003) The peptaibol database: a sequence and structure resource, *J Pept Sci* 9, 663-665.
45. Payne, J. W., Jakes, R., and Hartley, B. S. (1970) The primary structure of alamethicin, *Biochem J* 117, 757-766.
46. Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheimer, R. K., and Bruckner, H. (2003) Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled, *J Pept Sci* 9, 799-809.
47. Fox, R. O., Jr., and Richards, F. M. (1982) A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution, *Nature* 300, 325-330.
48. Duclohier, H., and Wroblewski, H. (2001) Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues, *J Membr Biol* 184, 1-12.
49. Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., and Roquebert, M. F. (1999) The peptaibol antibiotics from Trichoderma soil fungi; structural diversity and membrane properties, *Recent Res. Devel. Org. Biorg. Chem.* 3, 65-91.
50. Townsley, L. E., Tucker, W. A., Sham, S., and Hinton, J. F. (2001) Structures of gramicidins A, B, and C incorporated into sodium dodecyl sulfate micelles, *Biochemistry* 40, 11676-11686.
51. Goumon, Y., Strub, J. M., Moniatte, M., Nullans, G., Poteur, L., Hubert, P., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M. H. (1996) The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity, *Eur J Biochem* 235, 516-525.
52. Kieffer, B., Dillmann, B., Lefevre, J. F., Goumon, Y., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M. H. (1998) Solution conformation of the synthetic bovine proenkephalin-A209-237 by ¹H NMR spectroscopy, *J Biol Chem* 273, 33517-33523.
53. Salzet, M. (2001) Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses, *Trends Immunol* 22, 285-288.
54. Gause, G. F., and Brazhnikova, M. G. (1944) Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds., *Nature* 154, 703.
55. Lee, D. L., and Hodges, R. S. (2003) Structure-activity relationships of de novo designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S, *Biopolymers* 71, 28-48.
56. Sandrin, C., Peypoux, F., and Michel, G. (1990) Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by Bacillus subtilis, *Biotechnol Appl Biochem* 12, 370-375.
57. Ahimou, F., Jacques, P., and Deleu, M. (2000) Surfactin and iturin A effects on Bacillus subtilis surface hydrophobicity, *Enzyme Microb Technol* 27, 749-754.
58. Tsan, P., Volpon, L., Besson, F., and Lancelin, J. M. (2007) Structure and dynamics of surfactin studied by NMR in micellar media, *J Am Chem Soc* 129, 1968-1977.

59. Wieland, T. (1995) The history of peptide chemistry. In *Peptides: Synthesis, Structures and Applications* (Gutte B, ed.), *Academic Press*, 1-38.
60. Merrifield, B. (1995) The history of peptide chemistry. In *Peptides: Synthesis, Structures and Applications* (Gutte B, ed.), *Academic Press*, 93-169.
61. Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G., and Merrifield, R. B. (1990) All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4761-4765.
62. Matsuzaki, K., Nakamura, A., Murase, O., Sugishita, K., Fujii, N., and Miyajima, K. (1997) Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge, *Biochemistry* 36, 2104-2111.
63. Shin, S. Y., Lee, M. K., Kim, K. L., and Hahm, K. S. (1997) Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides, *J Pept Res* 50, 279-285.
64. Oh, D., Shin, S. Y., Lee, S., Kang, J. H., Kim, S. D., Ryu, P. D., Hahm, K. S., and Kim, Y. (2000) Role of the hinge region and the tryptophan residue in the synthetic antimicrobial peptides, cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) and its analogues, on their antibiotic activities and structures, *Biochemistry* 39, 11855-11864.
65. Javadpour, M. M., Juban, M. M., Lo, W. C., Bishop, S. M., Alberty, J. B., Cowell, S. M., Becker, C. L., and McLaughlin, M. L. (1996) De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, *J Med Chem* 39, 3107-3113.
66. Mai, J. C., Mi, Z., Kim, S. H., Ng, B., and Robbins, P. D. (2001) A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors, *Cancer Res* 61, 7709-7712.
67. Papo, N., Seger, D., Makovitzki, A., Kalchenko, V., Eshhar, Z., Degani, H., and Shai, Y. (2006) Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide, *Cancer Res* 66, 5371-5378.
68. Blazyk, J., Wiegand, R., Klein, J., Hammer, J., Epand, R. M., Epand, R. F., Maloy, W. L., and Kari, U. P. (2001) A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids, *J Biol Chem* 276, 27899-27906.
69. Horne, W. S., Wiethoff, C. M., Cui, C., Wilcoxon, K. M., Amorin, M., Ghadiri, M. R., and Nemerow, G. R. (2005) Antiviral cyclic D,L-alpha-peptides: targeting a general biochemical pathway in virus infections, *Bioorg Med Chem* 13, 5145-5153.
70. Mickelfield, J. (2004) Daptomycin structure and mechanism of action revealed, *Chem Biol* 11, 887-888.
71. Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F., and Gross, D. C. (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases, *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 266-292.
72. Avrahami, D., and Shai, Y. (2002) Conjugation of a magainin analogue with lipophilic acids controls hydrophobicity, solution assembly, and cell selectivity, *Biochemistry* 41, 2254-2263.
73. Mak, P., Pohl, J., Dubin, A., Reed, M. S., Bowers, S. E., Fallon, M. T., and Shafer, W. M. (2003) The increased bactericidal activity of a fatty acid-modified synthetic antimicrobial peptide of human cathepsin G correlates with its enhanced capacity to interact with model membranes, *Int J Antimicrob Agents* 21, 13-19.
74. Wakabayashi, H., Matsumoto, H., Hashimoto, K., Teraguchi, S., Takase, M., and Hayasawa, H. (1999) N-Acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity, *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1267-1269.

75. Majerle, A., Kidric, J., and Jerala, R. (2003) Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain, *J Antimicrob Chemother* 51, 1159-1165.
76. Makovitzki, A., Avrahami, D., and Shai, Y. (2006) Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15997-16002.
77. Kamysz, W., Silvestri, C., Cirioni, O., Giacometti, A., Licci, A., Della Vittoria, A., Okroj, M., and Scalise, G. (2007) In vitro activities of the lipopeptides palmitoyl (Pal)-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys alone and in combination with antimicrobial agents against multiresistant gram-positive cocci, *Antimicrob Agents Chemother* 51, 354-358.
78. Strom, M. B., Haug, B. E., Skar, M. L., Stensen, W., Stiberg, T., and Svendsen, J. S. (2003) The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides, *J Med Chem* 46, 1567-1570.
79. Fernandez-Lopez, S., Kim, H. S., Choi, E. C., Delgado, M., Granja, J. R., Khasanov, A., Kraehenbuehl, K., Long, G., Weinberger, D. A., Wilcoxon, K. M., and Ghadiri, M. R. (2001) Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture, *Nature* 412, 452-455.
80. Dartois, V., Sanchez-Quesada, J., Cabezas, E., Chi, E., Dubbelde, C., Dunn, C., Granja, J., Gritzen, C., Weinberger, D., Ghadiri, M. R., and Parr, T. R., Jr. (2005) Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides, *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3302-3310.
81. Appella, D. H., Christianson, L. A., Klein, D. A., Powell, D. R., Huang, X., Barchi, J. J., Jr., and Gellman, S. H. (1997) Residue-based control of helix shape in beta-peptide oligomers, *Nature* 387, 381-384.
82. Lee, H. S., Syud, F. A., Wang, X., and Gellman, S. H. (2001) Diversity in short beta-peptide 12-helices: high-resolution structural analysis in aqueous solution of a hexamer containing sulfonylated pyrrolidine residues, *J Am Chem Soc* 123, 7721-7722.
83. Daura, X., Gademann, K., Schafer, H., Jaun, B., Seebach, D., and van Gunsteren, W. F. (2001) The beta-peptide hairpin in solution: conformational study of a beta-hexapeptide in methanol by NMR spectroscopy and MD simulation, *J Am Chem Soc* 123, 2393-2404.
84. Glattli, A., Daura, X., Seebach, D., and van Gunsteren, W. F. (2002) Can one derive the conformational preference of a beta-peptide from its CD spectrum?, *J Am Chem Soc* 124, 12972-12978.
85. Hintermann, T., and Seebach, D. (1997) The Biological Stability of β -Peptides: No Interactions between α - and β -Peptidic Structures?, *51*, 244-247.
86. Schreiber, J. V., Frackenpohl, J., Moser, F., Fleischmann, T., Kohler, H. P., and Seebach, D. (2002) On the biodegradation of beta-peptides, *Chembiochem* 3, 424-432.
87. Tang, Y. C., and Deber, C. M. (2002) Hydrophobicity and helicity of membrane-interactive peptides containing peptoid residues, *Biopolymers* 65, 254-262.
88. Hamper, B. C., Kolodziej, S. A., Scates, A. M., Smith, R. G., and Cortez, E. (1998) Solid Phase Synthesis of beta-Peptoids: N-Substituted beta-Aminopropionic Acid Oligomers, *J Org Chem* 63, 708-718.
89. Shuey, S. W., Delaney, W. J., Shah, M. C., and Scialdone, M. A. (2006) Antimicrobial beta-peptoids by a block synthesis approach, *Bioorg Med Chem Lett* 16, 1245-1248.
90. Bailey, M. D., Halmos, T., Goudreau, N., Lescop, E., and Llinas-Brunet, M. (2004) Novel azapeptide inhibitors of hepatitis C virus serine protease, *J Med Chem* 47, 3788-3799.
91. Randolph, J. T., Zhang, X., Huang, P. P., Klein, L. L., Kurtz, K. A., Konstantinidis, A. K., He, W., Kati, W. M., and Kempf, D. J. (2008) Synthesis, antiviral activity, and

- conformational studies of a P3 aza-peptide analog of a potent macrocyclic tripeptide HCV protease inhibitor, *Bioorg Med Chem Lett* 18, 2745-2750.
92. Semetey, V., Rognan, D., Hemmerlin, C., Graff, R., Briand, J. P., Marraud, M., and Guichard, G. (2002) Stable helical secondary structure in short-chain N,N'-linked oligoureas bearing proteinogenic side chains, *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 1893-1895.
 93. Violette, A., Averlant-Petit, M. C., Semetey, V., Hemmerlin, C., Casimir, R., Graff, R., Marraud, M., Briand, J. P., Rognan, D., and Guichard, G. (2005) N,N'-linked oligoureas as foldamers: chain length requirements for helix formation in protic solvent investigated by circular dichroism, NMR spectroscopy, and molecular dynamics, *J Am Chem Soc* 127, 2156-2164.
 94. Meyer, J. P., Davis, P., Lee, K. B., Porreca, F., Yamamura, H. I., and Hruby, V. J. (1995) Synthesis using a Fmoc-based strategy and biological activities of some reduced peptide bond pseudopeptide analogues of dynorphin A1, *J Med Chem* 38, 3462-3468.
 95. Cho, C. Y., Moran, E. J., Cherry, S. R., Stephans, J. C., Fodor, S. P., Adams, C. L., Sundaram, A., Jacobs, J. W., and Schultz, P. G. (1993) An unnatural biopolymer, *Science* 261, 1303-1305.
 96. Cheguillaume, A., Lehardy, F., Bouget, K., Baudy-Floc'h, M., and Le Grel, P. (1999) Submonomer Solution Synthesis of Hydrazinoazapeptoids, a New Class of Pseudopeptides, *J Org Chem* 64, 2924-2927.
 97. Salaun, A., Potel, M., Roisnel, T., Gall, P., and Le Grel, P. (2005) Crystal structures of aza-beta3-peptides, a new class of foldamers relying on a framework of hydrazinoturns, *J Org Chem* 70, 6499-6502.
 98. Le Grel, P., Salaun, A., Potel, M., Le Grel, B., and Lassagne, F. (2006) Aza-beta3-cyclohexapeptides: pseudopeptidic macrocycles with interesting conformational and configurational properties slow pyramidal nitrogen inversion in 24-membered rings!, *J Org Chem* 71, 5638-5645.
 99. Dali, H., Busnel, O., Hoebeke, J., Bi, L., Decker, P., Briand, J. P., Baudy-Floc'h, M., and Muller, S. (2007) Heteroclitic properties of mixed alpha- and aza-beta3-peptides mimicking a supradominant CD4 T cell epitope presented by nucleosome, *Mol Immunol* 44, 3024-3036.
 100. Bradley, F. B., Gunstone, F. D., and Harwood, J. L. (1994) The lipid Handbook, second edition (Chapman & Hall, ed.), Chapter 3, 47-223.
 101. Odds, F. C., Brown, A. J., and Gow, N. A. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action, *Trends Microbiol* 11, 272-279.
 102. Yeaman, M. R., and Yount, N. Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol Rev* 55, 27-55.
 103. Breukink, E., van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J., and de Kruijff, B. (2003) Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes, *J Biol Chem* 278, 19898-19903.
 104. Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes., *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 1-10.
 105. Yang, L., Weiss, T. M., Lehrer, R. I., and Huang, H. W. (2000) Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin, *Biophys J* 79, 2002-2009.
 106. Almeida, P. F., and Pokorny, A. (2009) Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics, *Biochemistry* 48, 8083-8093.

107. Lee, M. T., Hung, W. C., Chen, F. Y., and Huang, H. W. (2008) Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5087-5092.
108. Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat Rev Microbiol* 3, 238-250.
109. Luque-Ortega, J. R., van't Hof, W., Veerman, E. C., Saugar, J. M., and Rivas, L. (2008) Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in Leishmania, *Faseb J* 22, 1817-1828.
110. Subbalakshmi, C., and Sitaram, N. (1998) Mechanism of antimicrobial action of indolicidin, *FEMS Microbiol Lett* 160, 91-96.
111. Park, C. B., Kim, H. S., and Kim, S. C. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions, *Biochem Biophys Res Commun* 244, 253-257.
112. Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* 55, 4-30.
113. Shai, Y. (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides, *Biopolymers* 66, 236-248.
114. Bechinger, B., and Lohner, K. (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides, *Biochim Biophys Acta* 1758, 1529-1539.
115. Gazit, E., Miller, I. R., Biggin, P. C., Sansom, M. S., and Shai, Y. (1996) Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes, *J Mol Biol* 258, 860-870.
116. Marassi, F. M., Opella, S. J., Juvvadi, P., and Merrifield, R. B. (1999) Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy, *Biophys J* 77, 3152-3155.
117. Rizzo, V., Stankowski, S., and Schwarz, G. (1987) Alamethicin incorporation in lipid bilayers: a thermodynamic study, *Biochemistry* 26, 2751-2759.
118. Chen, F. Y., Lee, M. T., and Huang, H. W. (2003) Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation, *Biophys J* 84, 3751-3758.
119. Rapaport, D., and Shai, Y. (1992) Aggregation and organization of pardaxin in phospholipid membranes. A fluorescence energy transfer study, *J Biol Chem* 267, 6502-6509.
120. Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L., and Huang, H. W. (1996) Membrane pores induced by magainin, *Biochemistry* 35, 13723-13728.
121. Murzyn, K., and Pasenkiewicz-Gierula, M. (2003) Construction of a toroidal model for the magainin pore, *J Mol Model* 9, 217-224.
122. Leontiadou, H., Mark, A. E., and Marrink, S. J. (2006) Antimicrobial peptides in action, *J Am Chem Soc* 128, 12156-12161.
123. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., and Huang, H. W. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophys J* 81, 1475-1485.
124. Lopez, C. F., Nielsen, S. O., Srinivas, G., Degrado, W. F., and Klein, M. L. (2006) Probing Membrane Insertion Activity of Antimicrobial Polymers via Coarse-grain Molecular Dynamics, *J Chem Theory Comput* 2, 649-655.
125. Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415, 389-395.
126. Viljanen, P., and Vaara, M. (1984) Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide, *Antimicrob Agents Chemother* 25, 701-705.

127. Sahly, H., Schubert, S., Harder, J., Rautenberg, P., Ullmann, U., Schroder, J., and Podschun, R. (2003) Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3, *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1739-1741.
128. Nichols, W. W., Dorrington, S. M., Slack, M. P., and Walmsley, H. L. (1988) Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate, *Antimicrob Agents Chemother* 32, 518-523.
129. Friedrich, C., Scott, M. G., Karunaratne, N., Yan, H., and Hancock, R. E. (1999) Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides, *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1542-1548.
130. Bachrach, G., Altman, H., Kolenbrander, P. E., Chalmers, N. I., Gabai-Gutner, M., Mor, A., Friedman, M., and Steinberg, D. (2008) Resistance of Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 to direct killing by antimicrobial peptides is protease independent, *Antimicrob Agents Chemother* 52, 638-642.
131. Shafer, W. M., Qu, X., Waring, A. J., and Lehrer, R. I. (1998) Modulation of Neisseria gonorrhoeae susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1829-1833.
132. Gunn, J. S., Hohmann, E. L., and Miller, S. I. (1996) Transcriptional regulation of Salmonella virulence: a PhoQ periplasmic domain mutation results in increased net phosphotransfer to PhoP, *J Bacteriol* 178, 6369-6373.
133. Li, M., Lai, Y., Villaruz, A. E., Cha, D. J., Sturdevant, D. E., and Otto, M. (2007) Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9469-9474.
134. Peschel, A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides?, *Trends Microbiol* 10, 179-186.
135. Perron, G. G., Zasloff, M., and Bell, G. (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide, *Proc Biol Sci* 273, 251-256.
136. Sanders, C. R., and Oxenoid, K. (2000) Customizing model membranes and samples for NMR spectroscopic studies of complex membrane proteins, *Biochim Biophys Acta* 1508, 129-145.
137. Opella, S. J. (1994) Solid-state NMR structural studies of proteins, *Annu Rev Phys Chem* 45, 659-683.
138. Klassen, R. B., and Opella, S. J. (1997) NMR studies of peptides and proteins associated with membranes, *Methods Mol Biol* 60, 271-297.
139. Henry, G. D., and Sykes, B. D. (1994) Methods to study membrane protein structure in solution, *Methods Enzymol* 239, 515-535.
140. Sanders, C. R., and Sonnichsen, F. (2006) Solution NMR of membrane proteins: practice and challenges, *Magn Reson Chem* 44 Spec No, S24-40.
141. Arora, A., and Tamm, L. K. (2001) Biophysical approaches to membrane protein structure determination, *Curr Opin Struct Biol* 11, 540-547.
142. Fernandez, C., and Wuthrich, K. (2003) NMR solution structure determination of membrane proteins reconstituted in detergent micelles, *FEBS Lett* 555, 144-150.
143. Roosild, T. P., Greenwald, J., Vega, M., Castronovo, S., Riek, R., and Choe, S. (2005) NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression, *Science* 307, 1317-1321.
144. Struppe, J., and Vold, R. R. (1998) Dilute bicellar solutions for structural NMR work, *J Magn Reson* 135, 541-546.
145. Whiles, J. A., Brasseur, R., Glover, K. J., Melacini, G., Komives, E. A., and Vold, R. R. (2001) Orientation and effects of mastoparan X on phospholipid bicelles, *Biophys J* 80, 280-293.

146. Prosser, R. S., Hwang, J. S., and Vold, R. R. (1998) Magnetically aligned phospholipid bilayers with positive ordering: a new model membrane system, *Biophys J* 74, 2405-2418.
147. Loudet, C., Manet, S., Gineste, S., Oda, R., Achard, M. F., and Dufourc, E. J. (2007) Biphenyl bicelle disks align perpendicular to magnetic fields on large temperature scales: a study combining synthesis, solid-state NMR, TEM, and SAXS, *Biophys J* 92, 3949-3959.
148. Loudet, C., Khemtemourian, L., Aussenac, F., Gineste, S., Achard, M. F., and Dufourc, E. J. (2005) Bicelle membranes and their use for hydrophobic peptide studies by circular dichroism and solid state NMR, *Biochim Biophys Acta* 1724, 315-323.
149. Baldus, M. (2006) Solid-state NMR spectroscopy: molecular structure and organization at the atomic level, *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 1186-1188.
150. Watts, A. (2005) Solid-state NMR in drug design and discovery for membrane-embedded targets, *Nat Rev Drug Discov* 4, 555-568.
151. Xu, Y., Yushmanov, V. E., and Tang, P. (2002) NMR studies of drug interaction with membranes and membrane-associated proteins, *Biosci Rep* 22, 175-196.
152. Da Costa, G., Mouret, L., Chevance, S., Le Rumeur, E., and Bondon, A. (2007) NMR of molecules interacting with lipids in small unilamellar vesicles, *Eur Biophys J* 36, 933-942.
153. Da Costa, G., Chevance, S., Le Rumeur, E., and Bondon, A. (2006) Proton NMR detection of porphyrins and cytochrome C in small unilamellar vesicles: role of the dissociation kinetic constant, *Biophys J* 90, L55-57.
154. Kimura, T., Okamura, E., Matubayasi, N., Asami, K., and Nakahara, M. (2004) NMR study on the binding of neuropeptide achatin-I to phospholipid bilayer: the equilibrium, location, and peptide conformation, *Biophys J* 87, 375-385.
155. Duval, E. (2008) *Thèse de l'université de Caen Basse Normandie*.
156. Duval, E., Zatylny, C., Laurencin, M., Baudy-Floc'h, M., and Henry, J. (2009) KKKKPLFGLFFGLF: a cationic peptide designed to exert antibacterial activity, *Peptides FIELD Full Journal Title:Peptides* 30, 1608-1612.
157. Andreu, D., and Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview, *Biopolymers FIELD Full Journal Title:Biopolymers* 47, 415-433.
158. Epand, R. M., and Vogel, H. J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action., *Biochimica Et Biophysica Acta* 1462, 11-28.
159. Hancock, R. E., and Chapple, D. S. (1999) Peptide antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother FIELD Full Journal Title:Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 1317-1323.
160. Zasloff, M. (2002) Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity, *Lancet* 360, 1116-1117.
161. Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol. FIELD Full Journal Title:Nature Reviews Microbiology* 3, 238-250.
162. Matsuzaki, K., Mitani, Y., Akada, K. Y., Murase, O., Yoneyama, S., Zasloff, M., and Miyajima, K. (1998) Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa, *Biochemistry* 37, 15144-15153.
163. Wu, M., Maier, E., Benz, R., and Hancock, R. E. (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of Escherichia coli, *Biochemistry* 38, 7235-7242.
164. Bechinger, B., and Lohner, K. (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1758, 1529-1539.

165. Baudy, F. H. M., Zatylnyj, G. C., Henry, J., Duval, E., and Laurencin, M. (2009) Antimicrobial pseudopeptides, drug and pharmaceutical composition containing them, p 30pp, (Serb, Fr.; Centre National de la Recherche Scientifique Cnrs; Universite de Caen Basse Normandie). Application: FR
- FR.
166. von Maltzahn, G., Vauthey, S., Santoso, S., and Zhang, S. (2003) Positively Charged Surfactant-like Peptides Self-assemble into Nanostructures, *Langmuir FIELD Full Journal Title:Langmuir* 19, 4332-4337.
167. Xu, H., Wang, J., Han, S., Wang, J., Yu, D., Zhang, H., Xia, D., Zhao, X., Waigh, T. A., and Lu, J. R. (2009) Hydrophobic-Region-Induced Transitions in Self-Assembled Peptide Nanostructures, *Langmuir FIELD Full Journal Title:Langmuir* 25, 4115-4123.
168. Ulijn, R. V., and Smith, A. M. (2008) Designing peptide based nanomaterials, *Chem. Soc. Rev. FIELD Full Journal Title:Chemical Society Reviews* 37, 664-675.
169. Da Costa, G., Chevance, S., Le Rumeur, E., and Bondon, A. (2006) Proton NMR detection of porphyrins and cytochrome c in small unilamellar vesicles: role of the dissociation kinetic constant, *Biophysical Journal* 90, L55-L57.
170. Balayssac, S., Burlina, F., Convert, O., Bolbach, G., Chassaing, G., and Lequin, O. (2006) Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency, *Biochemistry* 45, 1408-1420.
171. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., and Bienert, M. (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Lett* 501, 146-150.
172. Tsonchev, S., Niece, K. L., Schatz, G. C., Ratner, M. A., and Stupp, S. I. (2008) Phase diagram for assembly of biologically-active peptide amphiphiles, *J Phys Chem B* 112, 441-447.
173. Vauthey, S., Santoso, S., Gong, H., Watson, N., and Zhang, S. (2002) Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. FIELD Full Journal Title:Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5355-5360.
174. van Hell, A. J., Costa, C. I., Flesch, F. M., Sutter, M., Jiskoot, W., Crommelin, D. J., Hennink, W. E., and Mastrobattista, E. (2007) Self-assembly of recombinant amphiphilic oligopeptides into vesicles, *Biomacromolecules* 8, 2753-2761.
175. Yan, X., Cui, Y., He, Q., Wang, K., Li, J., Mu, W., Wang, B., and Ou-Yang, Z. C. (2008) Reversible transitions between peptide nanotubes and vesicle-like structures including theoretical modeling studies, *Chemistry* 14, 5974-5980.
176. Cocera, M., Lopez, O., Estelrich, J., Parra, J. L., and de la Maza, A. (2000) Kinetic and Structural Aspects of the Adsorption of Sodium Dodecyl Sulfate on Phosphatidylcholine Liposomes, *Langmuir* 16, 4068-4071.
177. Cocera, M., Lopez, O., Estelrich, J., Parra, J. L., and de la Maza, A. (2001) Use of a fluorescence spectroscopy technique to study the adsorption of sodium dodecylsulfonate on liposomes, *Chem Phys Lipids* 109, 29-36.
178. de la Maza, A., and Parra, J. L. (1995) Vesicle-micelle structural transitions of phospholipid bilayers and sodium dodecyl sulfate, *Langmuir* 11, 2435-2441.

ANNEXE I

Complément théorique sur la RMN

1. Principe de base de la RMN

Cette méthode exploite les propriétés magnétiques du spin nucléaire. En présence d'un champ magnétique statique B_0 , les moments magnétiques d'un échantillon vont s'orienter et s'organiser sur deux cônes d'axe B_0 correspondant à deux niveaux d'énergie α et β . Les spins précessent autour de B_0 à la pulsation ω_0 proportionnelle au champ magnétique, appelée pulsation de Larmor ω_0 , qui dépend du rapport gyromagnétique γ du noyau :

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

L'étude d'un spin isolé est impossible et ne présente aucun intérêt pratique, on ne peut étudier que la résultante macroscopique d'un ensemble d'un très grand nombre de spins identiques. À l'équilibre, en présence d'un champ magnétique statique B_0 , cette résultante est colinéaire à B_0 et se traduit par une aimantation M_0 dont l'intensité dépend des deux populations N_α et N_β des niveaux énergétiques α et β .

Lors d'une expérience RMN, on soumet l'échantillon à un champ alternatif radiofréquence B_1 de pulsation ω . La résonance se produit si la pulsation de B_1 est égale à la pulsation de Larmor : $\omega = \omega_0$, le champ B_1 va alors modifier les populations des niveaux d'énergie et basculer l'aimantation macroscopique perpendiculairement au champ B_0 . Lorsqu'on relâche le champ B_1 , l'aimantation revient à sa position d'équilibre dans un mouvement de précession de fréquence ω_0 qui génère un courant induit dans une bobine de détection. Ce signal correspond à une sinusoïde amortie dans le temps appelée FID (*free induction decay* ou signal de précession libre). Pour passer du domaine temporel au domaine des fréquences on applique une transformée de Fourier et l'on obtient un spectre RMN avec un pic à la fréquence de résonance ω_0 .

Les noyaux, ayant un rapport gyromagnétique γ , résonnent à la même fréquence ω_0 . Cependant des différences d'environnement électronique, lié à l'environnement des noyaux et à la nature des liaisons chimique dans lesquels ils sont engagés, vont entraîner des

modifications locales du champ magnétique B_0 ressenti par les noyaux et donc de leur fréquence de résonance. Les noyaux de même nature résonnent donc à différentes fréquences (proches de ω_0) caractéristiques de leur environnement électronique.

Le déplacement chimique δ (en ppm) est la grandeur utilisée pour mesurer les différentes fréquences de résonance ω de noyaux de même type, il est calculé suivant la relation :

$$\delta = 10^6 \times \frac{\omega - \omega_{\text{ref}}}{\omega_0},$$

où ω_{ref} est la pulsation de résonance d'un composé de référence pour lequel l'écrantage électronique des noyaux est fort, $\omega_0 = \gamma B_0$ est la fréquence de résonance du noyau à un champ B_0 .

Des séquences d'impulsions radiofréquences permettent de mettre en évidence différents types d'interactions entre les spins : à travers les liaisons (couplages scalaires $^1J, ^2J, ^3J, \dots$) et à travers l'espace (couplage dipolaire). Ainsi de manière simplifiée, des familles d'expériences multidimensionnelles permettent d'attribuer les déplacements chimiques d'une molécule (COSY, TOCSY...) et d'autres permettent d'obtenir des informations spatiales (NOESY, ROESY...) grâce à l'effet NOE (*Nuclear Overhauser Effect*).

2. La RMN pour les macromolécules biologiques

2.1 Amélioration du rapport S/N et progrès instrumentaux

La sensibilité d'une expérience RMN est quantifiable par le rapport signal sur bruit S/N , proportionnel aux paramètres suivant :

$$\frac{S}{N} \propto n A \frac{1}{T} B_0^{3/2} \gamma_{\text{exc}} \gamma_{\text{obs}}^{3/2} T_2^* \sqrt{N_{\text{scans}}}$$

où n est le nombre de molécules dans le volume de détection, A l'abondance des spins actifs, T la température, B_0 le champ magnétique statique, γ_{exc} et γ_{obs} les rapports gyromagnétiques des spins excités et observés, T_2^* est le temps de relaxation transversale apparent et N_{scans} est le nombre de scans (I).

La sensibilité augmente avec la concentration de l'échantillon (le nombre de spins observé) et avec l'intensité du champ magnétique. On observe que la sensibilité augmente avec le temps

de relaxation T_2^* qui est inversement proportionnel au temps de corrélation τ_c . Pour une protéine globulaire, τ_c est lui-même proportionnel à la taille de la molécule ou la viscosité du solvant, par la relation suivante :

$$\tau_c = \frac{\eta V}{kT}$$

où η est le coefficient de viscosité du milieu, k la constante de Boltzmann, T la température et V le volume de la molécule.

Par conséquent, plus la viscosité du solvant ou la taille de la molécule est importante et plus la sensibilité de l'expérience est faible. Comme T_2^* diminue, la largeur à mi-hauteur des pics de corrélation s'accroît et on perd en sensibilité et en résolution comme on peut le voir sur la Figure 1.

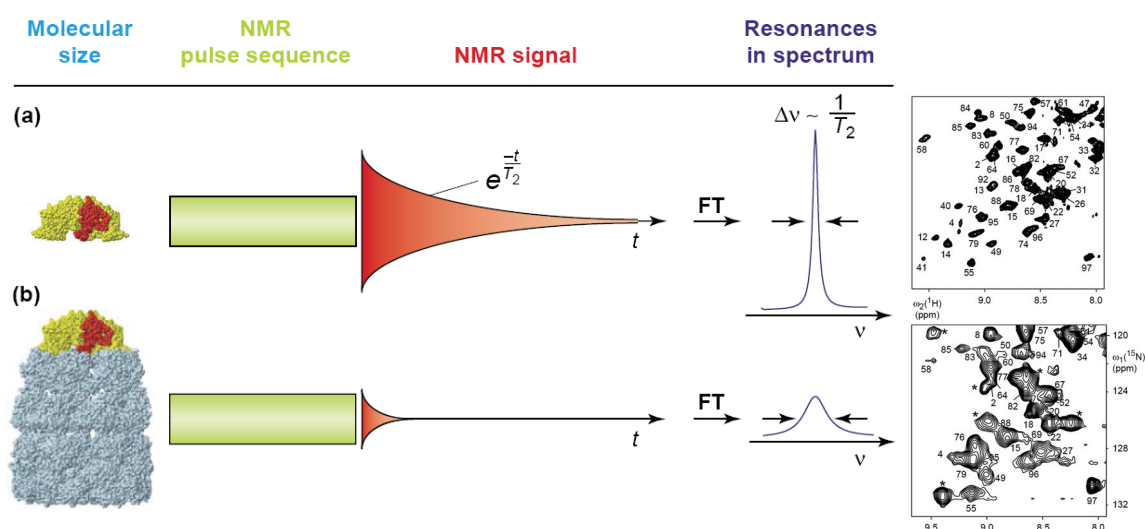


Figure 1 : Spectroscopie RMN de petites ou de grosses molécules (a) Les signaux RMN de petites molécules relaxent lentement, T_2 est long ce qui donne après transformée de fourrier des raies fines ($\Delta\nu$). (b) A l'inverse, les signaux RMN des grosses molécules relaxent rapidement, après transformée de Fourier les raies sont larges. (Fernandez et Wider, 2003)

De plus, l'augmentation du nombre de pics de corrélation avec le nombre de proton de la protéine sur une même fenêtre spectrale (~12 ppm pour le proton, 30 ppm pour l'azote) entraîne une superposition des signaux qui combinée avec l'élargissement des raies rend les spectres difficilement interprétables.

De nombreuses améliorations techniques ont permis un gain considérable en sensibilité des expériences RMN. On peut observer ces dernières années une montée en champ magnétique B_0 des spectromètres RMN jusqu'à atteindre aujourd'hui 1 Ghz. L'arrivée des cryosondes a

permis un gain de sensibilité majeur puisqu'à un champ donné, le rapport S/N d'un spectromètre équipé d'une crysonde est multiplié par 4. Néanmoins, le gain de sensibilité apporté par une crysonde décroît très rapidement avec la salinité du milieu.

2.2 Marquage isotopique et expériences hétéronucléaires

Les expériences multidimensionnelles classiques (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY) sont très difficilement utilisables pour des protéines dont la masse moléculaire dépasse les 10-12 kDa. Comme on l'a vu dans la partie précédente, le nombre de protons et le temps de corrélation d'une protéine sont proportionnels à sa masse moléculaire, entraînant une baisse de sensibilité et une dégénérescence des pics de corrélations.

Le marquage isotopique au ^{15}N ou ^{13}C permet l'étude par RMN de protéines jusqu'à 25-30 kDa. La résolution spectrale est augmentée avec l'augmentation du nombre de dimension des spectres RMN. Au même moment, l'efficacité du transfert de cohérence est augmentée en utilisant les couplages scalaires 1J et 2J relativement important entre hétéroatomes, et l'hétéroatome et son hydrogène qui lui est attaché, plutôt que le couplage scalaire homonucléaire 3J relativement faible.

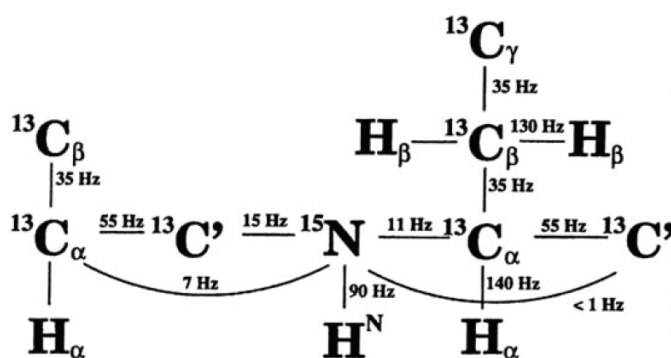


Figure 2 : Valeurs des constantes de couplages 1J et 2J pour une protéine

De plus, la détection indirecte via le proton est utilisée lorsque c'est possible afin d'optimiser la sensibilité des expériences. La polarisation du ^1H est initialement transférée vers le noyau hétéronucléaire, et à la fin de l'expérience, la cohérence hétéronucléaire est retransférée vers le proton pour la détection. Le gain de sensibilité est de $n (\gamma_I / \gamma_S)^{5/2}$ où γ_I et γ_S sont les rapports gyromagnétiques des noyaux I et S et n est le nombre de protons attachés au noyau S . Par exemple pour $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, le gain de sensibilité est de 24 pour un méthyle, 16 pour un méthylène et 8 pour un méthine, tandis que pour des corrélations $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ du proton amide, le

gain est d'environ 30. Pour comparaison, le gain de sensibilité d'une expérience qui commence par la polarisation d'un noyau S hétéronucléaire et où on détecte la magnétisation du proton avec une sonde classique est simplement le ratio des rapports gyromagnétiques γ_I/γ_S . Pour la corrélation ^1H - ^{13}C , le gain de sensibilité est de 4 pour un méthyle et de 10 les corrélations ^1H - ^{15}N par rapport aux expériences homonucléaires. L'excitation et la détection indirecte via le proton est possible, dans la séquence, grâce aux blocs INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer) et INEPT-inverse qui permettent respectivement le transfert de polarisation du proton vers les noyaux ^{15}N ou ^{13}C puis son retour vers le proton pour être détecté. Des sondes qui détectent le carbone en direct ont été développées pour les macromolécules ce qui évite de perdre en sensibilité lors du transfert de cohérence vers le proton à la fin de la séquence. Un exemple de séquence largement utilisée est l'expérience 2D ^1H - ^{15}N HSQC (*heteronuclear ^{15}N single quantum coherence*, Bodenhausen et Ruben 1980) qui corrèle les noyaux ^{15}N du squelette peptidique avec chaque proton amide qui lui est attaché. On obtient donc une carte à deux dimensions avec un pic de corrélation ^1H - ^{15}N pour chaque acide aminé, sauf pour les prolines qui n'ont pas de proton amide.

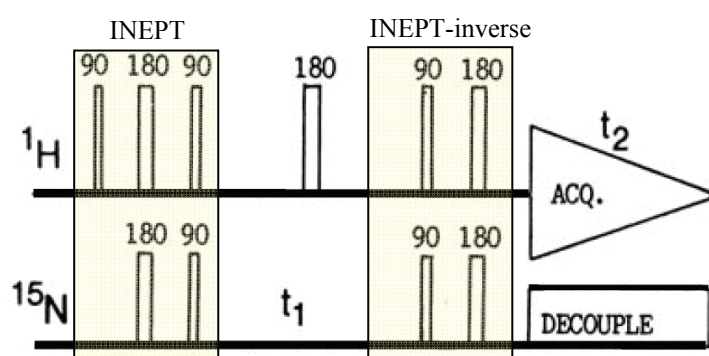


Figure 3 : Séquence d'impulsions pour l'expérience 2D ^1H - ^{15}N HSQC. Les blocs INEPT et INEPT-inverse sont encadrés. Les impulsions 90° et 180° sont respectivement représentées par des rectangles fins et plus larges. On remarque à la fin de la séquence l'acquisition en proton et le découplage en azote (GARP).

ANNEXE II

Tables de déplacements chimiques ^1H des peptides (ppm)

1. Déplacements chimiques du K4 dans l'eau avec ou sans détergents (SDS ou DPC)

« K4 » $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ à 283K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-----|----------------|------------|------------|---|
| K1 | no | 3.73 | 1.17 | γCH_2 1.41; δCH_2 1.62; ϵCH_2 2.72; ζNH_2 no |
| K2 | 8.54 | 4.04 | 1.47 | γCH_2 1.17; δCH_2 1.40; ϵCH_2 2.69; ζNH_2 no |
| K3 | 8.37 | 4.00 | 1.37 | γCH_2 1.37; δCH_2 1.44; ϵCH_2 2.68; ζNH_2 no |
| K4 | 8.25 | 4.22 | 1.41 | γCH_2 1.15; δCH_2 1.49; ϵCH_2 2.68; ζNH_2 no |
| P5 | - | 4.05 | 1.88, 1.48 | γCH_2 1.25; δCH_2 3.52, 3.28; ϵCH_2 |
| L6 | 8.08 | 3.95 | 1.25, 1.13 | γCH 1.25; δCH_3 0.59, 0.55 |
| F7 | 7.87 | 4.34 | 2.85, 2.73 | δCH 6.94; ϵCH 7.05; ζCH nd |
| G8 | 8.08 | 3.61, 3.45 | | |
| L9 | 7.79 | 3.94 | 1.17, 1.04 | γCH 1.17; δCH_3 0.59, 0.52 |
| F10 | 7.97 | 4.29 | 2.76, 2.63 | δCH 6.86; ϵCH 7.01; ζCH nd |
| F11 | 8.00 | 4.24 | 2.84, 2.66 | δCH 6.95; ϵCH 6.95; ζCH 6.95 |
| G12 | 7.63 | 3.55, 3.44 | | |
| L13 | 7.74 | 4.04 | 1.24, 1.18 | γCH 1.18; δCH_3 0.61, 0.54 |
| F14 | 7.49 | 4.15 | 2.88, 2.65 | δCH nd; ϵCH nd; ζCH nd |

« K4 » SDS 50mM, ($\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$) à 293K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-----|----------------|--------------|--------------|--|
| K1 | no | 3.98 | 1.800 | γCH_2 1.320; δCH_2 1.600; ϵCH_2 2.895; ζNH_2 no |
| K2 | 8.414 | 4.204 | 1.681 | γCH_2 1.355; δCH_2 1.565; ϵCH_2 2.855; ζNH_2 no |
| K3 | 8.060 | 4.160 | 1.658 | γCH_2 1.309; δCH_2 1.549; ϵCH_2 2.855; ζNH_2 no |
| K4 | 7.950 | 4.500 | 1.740, 1.600 | γCH_2 1.355; δCH_2 1.565; ϵCH_2 2.855; ζNH_2 no |
| P5 | - | 4.254 | 2.132 | γCH_2 1.840, 1.658; δCH_2 3.587 |
| L6 | 8.010 | 4.020 | 1.584, 1.300 | γCH 1.435; δCH_3 0.758, 0.680 |
| F7 | 7.730 | 4.220 | 3.060 | δCH 7.145 ; ϵCH 7.080; ζCH nd |
| G8 | 8.130 | 3.790, 3.710 | | |
| L9 | 7.660 | 3.990 | 1.557, 1.250 | γCH 1.420 ; δCH_3 0.736, 0.650 |
| F10 | 7.747 | 4.170 | 2.840 | δCH 6.810; ϵCH 6.980; ζCH nd |
| F11 | 7.940 | 4.260 | 2.850, 3.070 | δCH 7.187, 7.090; ϵCH ; ζCH |
| G12 | 7.790 | 3.840, 3.740 | | |
| L13 | 7.496 | 3.965 | 1.300, 0.965 | γCH 1.480; δCH_3 0.683, 0.612 |
| F14 | 7.226 | 4.287 | 2.655, 3.038 | δCH 7.050; ϵCH 6.910; ζCH nd |

« K4 » DPC 50mM (H₂O:D₂O) à 293K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-----|----------------|--------------|--------------|--|
| K1 | no | 3.953 | 1.842 | γ CH ₂ 1.394; δ CH ₂ 1.648; ϵ CH ₂ 2.946; ζ NH ₂ no |
| K2 | no | 4.285 | 1.725 | γ CH ₂ 1.392; δ CH ₂ 1.602; ϵ CH ₂ 2.909; ζ NH ₂ no |
| K3 | 8.482 | 4.239 | 1.717 | γ CH ₂ 1.388; δ CH ₂ 1.648; ϵ CH ₂ 2.946; ζ NH ₂ no |
| K4 | 8.393 | 4.514 | 1.613 | γ CH ₂ 1.415; δ CH ₂ 1.732; ϵ CH ₂ 2.886; ζ NH ₂ no |
| P5 | - | 4.360 | 2.146, 1.741 | γ CH ₂ 1.925; δ CH ₂ 3.583, 3.749; ϵ CH ₂ |
| L6 | 8.708 | 4.015 | 1.436, 1.615 | γ CH 1.436; δ CH ₃ 0.834, 0.779 |
| F7 | 8.409 | 4.361 | 3.115, 3.187 | δ CH 7.208; ϵ CH 7.208; ζ CH 7.208 |
| G8 | 8.188 | 3.861, 3.698 | | |
| L9 | 7.870 | 4.092 | 1.277, 1.522 | γ CH 1.578; δ CH ₃ 0.810, 0.757 |
| F10 | 7.871 | 4.317 | 3.045, 2.876 | δ CH 7.027; ϵ CH 7.027; ζ CH 7.027 |
| F11 | 7.996 | 4.316 | 2.972, 3.174 | δ CH 7.208; ϵ CH 7.208; ζ CH 7.208 |
| G12 | 8.077 | 3.870 | | |
| L13 | 7.697 | 4.068 | 1.561, 1.441 | γ CH 1.171; δ CH ₃ 0.801, 0.748 |
| F14 | 7.308 | 4.353 | 3.161, 2.813 | δ CH 7.170; ϵ CH 7.170; ζ CH 7.170 |

2. Déplacements chimiques de AD, AK, ABK et K-Nal en présence de 50 mM de SDS

« AD » H₂O:D₂O à 298K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-----|----------------|------------|------------|--|
| A1 | no | 3.98 | 1.41 | |
| L2 | 8.52 | 4.30 | 1.50 | γ CH 1.50; δ CH ₃ 0.81, 0.77 |
| S3 | 8.32 | 4.35 | 3.77 | |
| G4 | 8.38 | 3.87 | | |
| D5 | 8.24 | 4.54 | 2.68 | |
| A6 | 8.18 | 4.07 | 1.16 | |
| F7 | 7.85 | 4.42 | 3.04, 2.90 | δ CH 7.15; ϵ CH 7.27; ζ CH 7.21 |
| L8 | 7.73 | 4.12 | 1.45 | γ CH 1.36; δ CH ₃ 0.79, 0.74 |
| R9 | 7.95 | 4.08 | 3.00 | γ CH ₂ 1.53; δ CH ₂ 1.30; ϵ NH 7.52 |
| F10 | 8.00 | 4.48 | 3.07, 2.86 | δ CH 7.19 ; ϵ CH 7.26; ζ CH 7.21 CO-NH ₂ 7.39, 6.99 |

« AK » H₂O:D₂O à 298K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-----|----------------|------------|------------|--|
| A1 | no | 4.00 | 1.41 | |
| L2 | 8.52 | 4.31 | 1.53 | γ CH 1.53; δ CH ₃ 0.80 |
| S3 | 8.32 | 4.38 | 3.78 | |
| G4 | 8.37 | 3.90 | | |
| K5 | 8.11 | 4.16 | 1.68, 1.60 | γ CH ₂ 1.30; δ CH ₂ 1.58; ϵ CH ₂ 2.88 ; ζ NH ₂ 7.46 |
| A6 | 8.15 | 4.15 | 1.21 | |
| F7 | 7.96 | 4.47 | 3.02, 2.92 | δ CH 7.13; ϵ CH 7.13; ζ CH 7.04 |
| L8 | 7.88 | 4.18 | 1.47 | γ CH 1.36 ; δ CH ₃ 0.81, 0.75 |
| R9 | 8.02 | 4.10 | 3.04 | γ CH ₂ 1.56 ; δ CH ₂ 1.36 ; ϵ NH 7.05 |
| F10 | 8.05 | 4.53 | 3.10, 2.90 | δ CH 7.19 ; ϵ CH 7.26 ; ζ CH 7.21 CO-NH ₂ 7.41, 6.99 |

« AD » SDS 50 mM H₂O:D₂O à 283K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-----|----------------|------------|------------|--|
| A1 | no | 4.05 | 1.41 | |
| L2 | 8.37 | 4.23 | 1.61, 1.53 | γ CH 1.61 ; δ CH ₃ 0.82, 0.80 |
| S3 | 8.23 | 4.22 | 3.75 | |
| G4 | 8.22 | 3.96, 3.82 | | |
| D5 | 8.16 | 4.39 | 2.71 | |
| A6 | 8.27 | 3.96 | 1.17 | |
| F7 | 7.63 | 4.35 | 3.10; 2.96 | δ CH 7.14; ϵ CH 7.14; ζ CH 7.05 |
| L8 | 7.58 | 3.98 | 1.61 | γ CH 1.49; δ CH ₃ 0.78, 0.73 |
| R9 | 7.58 | 3.91 | 1.48, 1.38 | γ CH ₂ 0.99, 0.87; δ CH ₂ 2.83, 2.77; ϵ NH 6.83 |
| F10 | 7.47 | 4.44 | 3.16, 2.76 | δ CH 7.20 ; ϵ CH 7.12; ζ CH 7.00 CO-NH2 6.61, 6.34 |

« AK » SDS 50 mM H₂O:D₂O à 283K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-----|----------------|------------|------------|--|
| A1 | no | 3.95 | 1.31 | |
| L2 | 8.30 | 4.11 | 1.51 | γ CH 1.51; δ CH ₃ 0.72 |
| S3 | 8.39 | 4.20 | 3.75 | |
| G4 | 8.25 | 3.92, 3.76 | | |
| K5 | 7.79 | 3.78 | 1.55 | γ CH ₂ 1.19; δ CH ₂ 1.43; ϵ CH ₂ 2.75 ; ζ NH ₂ 7.20 |
| A6 | 8.35 | 3.87 | 1.12 | |
| F7 | 7.62 | 4.16 | 2.95, 2.85 | δ CH 7.04; ϵ CH 7.04; ζ CH 6.96 |
| L8 | 7.69 | 3.86 | 1.54, 1.30 | γ CH 1.45; δ CH ₃ 0.66 |
| R9 | 7.49 | 3.78 | 1.40, 1.26 | γ CH ₂ 0.73 ; δ CH ₂ 2.76, 2.59; ϵ NH 6.50, 6.22 |
| F10 | 8.05 | 4.53 | 3.10, 2.90 | δ CH 7.19 ; ϵ CH 7.26 ; ζ CH CO-NH2 7.07 6.78 |

« A β ³K » SDS H₂O:D₂O à 300,6K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-------|----------------|------------|------------|---|
| A1 | no | 3.97 | 1.32 | |
| L2 | 8.35 | 4.05 | 1.38, 1.51 | γ CH 1.51 ; δ CH ₃ 0.68 0.72 |
| S3 | 7.91 | 4.08 | 3.66, 3.58 | |
| G4 | 8.07 | 3.67 | | |
| azaK5 | 8.60 | - | 2.58, 2.45 | γ CH ₂ 1.28, 1.21; δ CH ₂ 1.53, 1.40; ϵ CH ₂ 2.73 ; ζ NH ₂ 7.26 HS 3.18, 3.08 |
| A6 | 7.78 | 3.98 | 1.01 | |
| F7 | 7.71 | 4.39 | 2.82, 2.98 | δ CH 7.05; ϵ CH 7.01; ζ CH 6.91 |
| L8 | 7.68 | 3.89 | 1.48, 24 | γ CH 1.22; δ CH ₃ 0.66, 0.62 |
| R9 | 7.60 | 3.87 | 1.38 | γ CH ₂ 0.99, 0.88; δ CH ₂ 2.76; ϵ NH 6.76 |
| F10 | 7.25 | 4.35 | 2.69, 3.02 | δ CH 7.04 ; ϵ CH 7.01; ζ CH 7.00 CO-NH2 7.12, 6.81 |

« K-2Nal » SDS H₂O:D₂O à 298K, pH 5

| AA | H ^N | H α | H β | Others |
|-------|----------------|------------|------------|--|
| A1 | no | 4.12 | 1.50 | |
| L2 | 8.46 | 4.26 | 1.69, 1.61 | γ CH 1.68; δ CH ₃ 0.84 |
| S3 | 8.19 | 4.33 | 3.89, 3.82 | |
| G4 | 8.24 | 3.88 | | |
| K5 | 7.73 | 4.02 | 1.49 | γ CH ₂ 1.18; δ CH ₂ 1.49; ϵ CH ₂ 2.85 ; ζ NH ₂ 7.31, 7.33 |
| A6 | 7.78 | 3.95 | 0.907 | |
| Nal7 | 8.82 | - | 4.13; 4.1 | γ 2CH 7.82; δ 1CH 7.53; ϵ 1CH 7.69; ζ CH ?; HS 3.65, 3.55 |
| L8 | 8.63 | 4.09 | 1.51, 1.39 | γ CH 1.51; δ CH ₃ 0.80, 0.76 |
| R9 | 7.46 | 3.96 | 1.12, 1.02 | γ CH ₂ 0.91; δ CH ₂ 2.55; ϵ NH 6.67 |
| Nal10 | 8.86 | - | 4.05 | γ 2CH 7.73 δ 1CH 7.48 ; ϵ 1CH 7.64; ζ CH 7.00 ?; HS 3.58; CO-NH ₂ 6.44 |

ANNEXE III

La modélisation avec ARIA/CNS Fichiers de topologie et de paramètres utilisés lors des calculs

1. La modélisation moléculaire avec les logiciels ARIA/CNS

CNS⁹ (2) est un logiciel de modélisation moléculaire qui utilise des méthodes de recuit simulé pour déterminer des structures tridimensionnelles de macromolécules à partir des données expérimentales obtenues par radiocristallographie ou par RMN. ARIA¹⁰ (3) est un logiciel qui utilise CNS pour générer des structures 3D suivant un processus itératif, à partir d'une liste de déplacements chimiques et une liste de pics NOE partiellement attribuée. ARIA permet d'automatiser les étapes d'attribution des pics NOE, de calibrer les intensités de ces pics NOE et de générer un fichier de contraintes CNS pour le calcul des structures. L'avantage d'ARIA est de pouvoir utiliser des contraintes de distance ambiguës, ceci est particulièrement utile lors de la modélisation de protéines de taille importante où la superposition des signaux est fréquente. Je ne décrirai pas en détail le fonctionnement d'ARIA pour privilégier la description des modifications apportées aux fichiers et aux protocoles de CNS et ARIA, et qui ont été nécessaires pour la modélisation de pseudopeptides. Il convient, en effet, de définir les nouveaux résidus et d'ajouter des définitions de la liaison peptidique entre les acides α -aminés classiques et les résidus aza- β^3 . Les fichiers modifiés sont les fichiers topologies et paramètres de CNS (topallhdg5.3.pro, topallhdg5.3.pep et parallhdg5.3.pro) et les fichiers de nomenclature d'ARIA (atomnames.xml, iupac.xml, PseudoAtom.py, Nomenclature.py et AminoAcid.py). De plus, quelques modifications du protocole d'ARIA sont nécessaires, notamment pour la modélisation de peptides cycliques, dans l'espace des angles de torsion. F. Vovelle (UPR 4301, CBM Orléans) a construit les premiers résidus aza- β^3 et m'a montré comment générer des pseudopeptides avec des conformations étendues avec CNS. Le manuel et la *mailing list* d'ARIA m'ont permis de calculer les structures de ces pseudopeptides avec ARIA en utilisant des contraintes RMN. Les modifications des fichiers *.xml et *.py sont assez intuitives et ponctuelles, je vais donc détailler plutôt le travail effectué dans les fichiers de CNS.

⁹ <http://cns-online.org/v1.21/>

¹⁰ <http://aria.pasteur.fr/>

2. Fichiers de topologie et paramètres des résidus aza- β^3

Les résidus aza- β^3 -lysine, aza- β^3 -1-naphtylalanine et aza- β^3 -2-naphtylalanine ont respectivement été appelés en code 3 lettres: AZK, NAF et NAL. L'atome d'azote qui substitue le C $_{\alpha}$ s'appelle NS et les atomes du groupement méthylène en α sont CS pour le carbone et les atomes HS1 et HS2 pour les hydrogènes. Les paramètres (longueurs de liaison et angles) ont été définis à partir des structures cristallographiques obtenues en milieu organique par le groupe P. le Grel (4, 5). Les résidus ont été construits et les charges calculées avec le logiciel SYBYL. La description de la topologie et les paramètres de ces résidus ont été ajoutés respectivement dans les fichiers topologie topallhdg5.3.top et paramètre parallhdg5.3.pro.

2.1 Topologie du résidu AZK (topallhdg5.3.pro)

```

residue AZK
group
  atom N    type=NH1    charge=-0.570 end
  atom HN   type=H      charge= 0.370 end
  atom NS   type=NH3    charge=-0.200 end      ! remplace le CA
  atom CB   type=CH2E   charge= 0.000 end
  atom HB1  type=HA     charge= 0.000 end
  atom HB2  type=HA     charge= 0.000 end
  atom CG   type=CH2E   charge= 0.000 end
  atom HG1  type=HA     charge= 0.000 end
  atom HG2  type=HA     charge= 0.000 end
  atom CD   type=CH2E   charge= 0.000 end
  atom HD1  type=HA     charge= 0.000 end
  atom HD2  type=HA     charge= 0.000 end
  atom CE   type=CH2E   charge= 0.310 end
  atom HE1  type=HA     charge= 0.000 end
  atom HE2  type=HA     charge= 0.000 end
  atom NZ   type=NH3    charge=-0.300 end
  atom HZ1  type=HC     charge= 0.330 end
  atom HZ2  type=HC     charge= 0.330 end
  atom HZ3  type=HC     charge= 0.330 end
  atom CS   type=CH2E   charge= 0.400 end      ! méthylène en  $\alpha$ 
  atom HS1  type=HA     charge= 0.000 end      ! méthylène
  atom HS2  type=HA     charge= 0.000 end      ! méthylène
  atom C    type=C      charge= 0.500 end
  atom O    type=O      charge=-0.500 end

bond N    HN              ! Définition des liaisons
bond N    NS
bond NS   CB      bond CB HB1      bond CB HB2
bond CB   CG      bond CG HG1      bond CG HG2
bond CG   CD      bond CD HD1      bond CD HD2
bond CD   CE      bond CE HE1      bond CE HE2
bond CE   NZ      bond NZ HZ1      bond NZ HZ2      bond NZ HZ3
bond NS   CS
bond CS   C
bond CS   HS1
bond CS   HS2

```

```

bond C O

improper HB1 HB2 NS CG !stereo CB ! Définition des angles
improper HG1 HG2 CB CD !stereo CG ! impropres
improper HD1 HD2 CG CE !stereo CD
improper HE1 HE2 CD NZ !stereo CE
improper HZ1 HZ2 CE HZ3 !methyl NZ

dihedral CG CB NS N ! Définition des angles
dihedral CD CG CB NS ! dièdres
dihedral CE CD CG CB
dihedral NZ CE CD CG
dihedral HZ1 NZ CE CD ! UCL stagger NH3 group 12-MAR-00

DONO HN N
DONO HZ1 NZ
DONO HZ2 NZ
DONO HZ3 NZ
ACCE O C
end

```

2.2 Topologie du résidu NAF:

```

residue NAF
group
  atom N type=NH1 charge=-0.570 end
  atom HN type=H charge= 0.370 end
  atom NS type=NH3 charge=-0.200 end
  atom CB type=CH2E charge= 0.000 end
  atom HB1 type=HA charge= 0.000 end
  atom HB2 type=HA charge= 0.000 end
  atom CG1 type=CF charge= 0.000 exclude=(CZ1) end
  atom CD1 type=CR1E charge= 0.000 exclude=(CE2) end
  atom HD1 type=HA charge= 0.000 end
  atom CD2 type=CR1E charge= 0.000 exclude=(CE1) end
  atom CE1 type=CR1E charge= 0.000 exclude=(CD2) end
  atom HE1 type=HA charge= 0.000 end
  atom CE2 type=CR1E charge= 0.000 exclude=(CD1) end
  atom CZ1 type=CR1E charge= 0.000 exclude=(CG1) end
  atom HZ1 type=HA charge= 0.000 end
  atom CG2 type=CF charge= 0.000 exclude=(CZ2) end
  atom HG2 type=HA charge= 0.000 end
  atom CD3 type=CR1E charge= 0.000 exclude=(CE2) end
  atom HD3 type=HA charge= 0.000 end
  atom CE3 type=CR1E charge= 0.000 exclude=(CD2) end
  atom HE3 type=HA charge= 0.000 end
  atom CZ2 type=CR1E charge= 0.000 exclude=(CG2) end
  atom HZ2 type=HA charge= 0.000 end
  atom CS type=CH2E charge= 0.400 end
  atom HS1 type=HA charge= 0.000 end
  atom HS2 type=HA charge= 0.000 end
  atom C type=C charge= 0.500 end
  atom O type=O charge=-0.500 end

bond N HN
bond N NS
bond NS CB bond CB HB1 bond CB HB2
bond CB CG1
bond CG1 CD1 bond CD1 HD1
bond CG1 CD2 bond CD3 HD3

```

```

bond CD1 CE1      bond CE1 HE1
bond CD2 CE2      bond CE3 HE3
bond CE1 CZ1      bond CZ1 HZ1
bond CE2 CZ1
bond CG2 CD2
bond CG2 HG2
bond CG2 CD3
bond CD3 CE3
bond CE3 CZ2      bond CZ2 HZ2
bond CE2 CZ2
bond NS CS
bond CS C
bond CS HS1
bond CS HS2
bond C O

improper HB1 HB2 NS CG1 !stereo CB

! Hs and CB around the ring
improper HD3 CD3 CE3 CZ2
improper HE3 CE3 CZ2 CE2
improper HZ1 CZ1 CE1 CD1
improper HZ2 CZ2 CE2 CD2
improper HE1 CE1 CD1 CG1
improper HD1 CD1 CG1 CD2
improper CB CG1 CD2 CE2

! around the ring
improper CG1 CD1 CE1 CZ1
improper CD1 CE1 CZ1 CE2
improper CE1 CZ1 CE2 CD2
improper CZ1 CE2 CD2 CG1
improper CE2 CD2 CG1 CD1
improper CD2 CG1 CD1 CE1

improper CG2 CD2 CE2 CZ2
improper CD2 CE2 CZ2 CE3
improper CE2 CZ2 CE3 CD3
improper CZ2 CE3 CD3 CG2
improper CE3 CD3 CG2 CD2
improper CD3 CG2 CD2 CE2

dihedral CG1 CB NS N
dihedral CD1 CG1 CB NS

DONO HN N
ACCE O C
end

```

2.3 Topologie du résidu NAL:

```

residue NAL
group
atom N type=NH1 charge=-0.570 end
atom HN type=H charge= 0.370 end
atom NS type=NC2 charge=-0.200 end
atom CB type=CH2E charge= 0.000 end
atom HB1 type=HA charge= 0.000 end
atom HB2 type=HA charge= 0.000 end

```

```

atom CG1 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CZ1) end
atom CD1 type=CF        charge= 0.000 exclude=(CE2) end
atom HG1 type=HA        charge= 0.000 end
atom CD2 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CE1) end
atom CE1 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CD2) end
atom HE1 type=HA        charge= 0.000 end
atom CE2 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CD1) end
atom CZ1 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CG1) end
atom HZ1 type=HA        charge= 0.000 end
atom CG2 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CZ2) end
atom HG2 type=HA        charge= 0.000 end
atom CD3 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CE2) end
atom HD3 type=HA        charge= 0.000 end
atom CE3 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CD2) end
atom HE3 type=HA        charge= 0.000 end
atom CZ2 type=CR1E      charge= 0.000 exclude=(CG2) end
atom HZ2 type=HA        charge= 0.000 end
atom CS type=CH2E       charge= 0.400 end
atom HS1 type=HA        charge= 0.000 end
atom HS2 type=HA        charge= 0.000 end
atom C type=C           charge= 0.500 end
atom O type=O           charge=-0.500 end

bond N HN
bond N NS
bond NS CB      bond CB HB1      bond CB HB2
bond CB CD1bond CG1 HG1
bond CG1 CD1
bond CG1 CD2      bond CD3 HD3
bond CD1 CE1      bond CE1 HE1
bond CD2 CE2      bond CE3 HE3
bond CE1 CZ1      bond CZ1 HZ1
bond CE2 CZ1      bond CG2 HG2
bond CG2 CD2
bond CG2 CD3
bond CD3 CE3
bond CE3 CZ2      bond CZ2 HZ2
bond CE2 CZ2
bond NS CS
bond CS C
bond CS HS1
bond CS HS2
bond C O

improper HB1 HB2 NS CD1 !stereo CB

! Hs and CB around the ring
improper HD3 CD3 CE3 CZ2
improper HE3 CE3 CZ2 CE2
improper HZ1 CZ1 CE1 CD1
improper HZ2 CZ2 CE2 CD2
improper HE1 CE1 CD1 CG1
improper HG1 CG1 CD2 CE2
improper CB CD1 CG1 CD2

! around the ring
improper CG1 CD1 CE1 CZ1
improper CD1 CE1 CZ1 CE2
improper CE1 CZ1 CE2 CD2
improper CZ1 CE2 CD2 CG1

```

```

improper CE2 CD2 CG1 CD1
improper CD2 CG1 CD1 CE1

improper CG2 CD2 CE2 CZ2
improper CD2 CE2 CZ2 CE3
improper CE2 CZ2 CE3 CD3
improper CZ2 CE3 CD3 CG2
improper CE3 CD3 CG2 CD2
improper CD3 CG2 CD2 CE2

dihedral CD1 CB NS N
dihedral CE1 CD1 CB NS

DONO HN N
ACCE O C
end

```

2.4 Paramètres des résidus (parallhdg5.3.pro)

| | | | | | | | | |
|----------|------|------|------|----------|--------|--------|--------|------------|
| BOND | CF | HA | | 1000.000 | {sd= | 0.001} | | 0.930 |
| BOND | CH1E | NC2 | | 1000.000 | {sd= | 0.001} | | 1.458 |
| BOND | CH2E | NC2 | | 1000.000 | {sd= | 0.001} | | 1.458 |
| BOND | NH1 | NC2 | | 1000.000 | {sd= | 0.001} | | 1.410 |
| BOND | NH3 | NC2 | | 1000.000 | {sd= | 0.001} | | 1.410 |
| | | | | | | | | |
| ANGLE | C | CH2E | NC2 | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 113.0000 |
| ANGLE | C | NH1 | NC2 | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 120.0000 |
| ANGLE | C | NH3 | NC2 | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 120.0000 |
| | | | | | | | | |
| ANGLE | CF | CH2E | NC2 | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 112.0000 |
| ANGLE | CF | CR1E | CF | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 118.4300 |
| ANGLE | CH2E | C | NH1 | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 116.1998 |
| | | | | | | | | |
| ANGLE | NC2 | CH2E | CH2E | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 114.0589 |
| ANGLE | NC2 | NH1 | H | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 119.2367 |
| ANGLE | NC2 | NH3 | H | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 119.2367 |
| ANGLE | NC2 | CH2E | HA | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 109.4694 |
| ANGLE | CH2E | NC2 | CH2E | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 114.0000 |
| ANGLE | CH2E | NC2 | NH1 | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 110.0000 |
| ANGLE | CH2E | NC2 | NH3 | 500.00 | {sd= | 0.031} | | 110.0000 |
| | | | | | | | | |
| IMPRoper | CF | NC2 | HA | HA | 500.00 | {sd= | 0.031} | 0 -70.0169 |
| IMPRoper | CH2E | C | NH1 | H | 500.00 | {sd= | 0.031} | 0 0.0000 |
| IMPRoper | CH2E | NC2 | HA | HA | 500.00 | {sd= | 0.031} | 0 -70.0781 |

2.5 Le groupement amine en Cterminal

L'ajout d'un groupement amine en C-terminal peut être effectué de deux façons soit en ajoutant un dernier résidu appelé NHH ou en utilisant le « résidu » CTN à la place du CTER classique pour les protéines. Nous avons utilisé le résidu CTN déjà défini dans le fichier topallhdg5.3.top, il a été néanmoins nécessaire d'ajouter des paramètres dans le fichier parallhdg5.3.pro et de modifier les fichiers atomnames.xml, iupac.xml et topallhdg5.3.pep:

parallhdg5.3.pro

```
BOND C CH3E 1000.000 {sd= 0.001} 1.516

ANGLE C CH3E HA 500.00 {sd= 0.031} 109.50
ANGLE CH3E C O 500.00 {sd= 0.031} 121.25
ANGLE CH3E C N 500.00 {sd= 0.031} 115.70
ANGLE CH3E C NH1 500.00 {sd= 0.031} 117.50

ANGLE CH1E C NH2 500.00 {sd= 0.031} 120.00

IMPRoper HA HA C HA 500.00 0 -66.5140
IMPRoper C CH3E NH1 O 500.00 0 0.0000
IMPRoper CH3E C NH1 CH1E 500.00 0 180.0000
IMPRoper C CH1E NH2 O 500.00 0 0.0000
IMPRoper C NH2 O H 500.00 0 0.0000
IMPRoper NH2 H H C 500.00 0 0.0000
```

topallhdg5.3.pep

```
last CTN head - *          end
!last CTER head - *        end
```

atomnames.py

Dans la définition du dernier résidu, on modifie le groupement C_AMIDO pour remplacer le HT par H1 et H2.

```
<terminus terminus_type="C_AMIDO">
  <atom_name name="O"/>
  <atom_name name="NT"/>
  <atom_name name="H1"/>
  <atom_name name="H2"/>
</terminus>
```

Une fois tous les constituants du peptide définis, il est nécessaire de redéfinir les liaisons peptidiques en considérant la présence de résidus aza- β^3 .

3. Fichiers de topologie des liaisons peptidiques autour des résidus aza- β^3

La liaison peptidique est définie initialement par le « presidue » PEPT dans le fichier de topologie à partir des atomes CA, C, O, N, HN. Il est donc nécessaire de redéfinir la topologie et les paramètres de la liaison peptique en considérant l'alternance résidus α et acides aminées aza- β^3 avec les nouveaux atomes CS et NS. Deux nouveaux « presidues » ont été définis pour les liaisons entre les résidus α – aza- β^3 et aza- β^3 – α , que l'on a nommé respectivement PEZP et PEPZ. Les lignes insérées dans le fichier topologie sont décrites ci-dessous.

Pour que le calcul dans ARIA prenne en compte les paramètres de ces nouvelles liaisons, il est nécessaire de modifier le fichier *generate.inp* dans le dossier *protocols* de chaque *run*. Par exemple dans de l' α^3 K où il y a une aza- β^3 -lysine en position 5.

```

patch pepz
  reference="-"=( resid 4 )
  reference="+"=( resid 5 )
end
patch pezp
  reference="-"=( resid 5 )
  reference="+"=( resid 6 )
end

```

3.1 Topologie de la liaison peptidique précédant un résidu aza- β^3

```

presidue PEPZ      ! PEPTide bond link, for the  *(-) - (+)AZA link
                  ! "*"(-) - PEPT - (+)*:
  add bond -C +N

  add angle -CA -C +N
  add angle -O  -C +N
  add angle -C  +N +NS
  add angle -C  +N +HN

  add improper -C -CA +N -O      ! planar -C
  add improper +N -C +NS +HN     ! planar +N
  add improper -CA -C  +N +NS    ! angle across peptide plane

! phi/psi related topology UCL 05-JUL-01

  add dihedral -C +N +NS +CH2E mult 6
  add dihedral -C +N +NS +CB mult 6
  add dihedral -CB -CA -C +N mult 6
  add dihedral -CB -CA -C +O mult 6
end

```

3.2 Topologie de la liaison peptidique après un résidu aza- β^3

```

presidue PEZP      ! PEPTide bond link, for the  *(-) AZA - (+) link
                  ! "*"(-) - PEPT - (+)*:
  add bond -C +N

  add angle -CS -C +N
  add angle -O  -C +N
  add angle -C  +N +CA
  add angle -C  +N +HN

  add improper -O  -C  +N  +CA      ! 1st angle across peptide plane
  add improper +HN +N  -C  -CS      ! 2nd angle across peptide plane
  add improper -CS -C  +N  +CA      ! 3rd angle across peptide plane

! phi/psi related topology UCL 05-JUL-01

  add dihedral -C +N +CA +C mult 6
  add dihedral -C +N +CA +CB mult 6
  add dihedral -NS -CS -C +N mult 6
  add dihedral -NS -CS -C +O mult 6
end

```


3.3 Paramètres des liaisons peptidiques entourant un résidu aza- β^3

```
! peptide group (modified 14-MAR-00)
! omega modified again (MN, 18-MAR-02)

IMPRoper  NH1  C      NC2  H          500.00  0      0.0000 !
IMPRoper  NH3  C      NC2  H          500.00  0      0.0000 !

IMPRoper  CH2E C      NH1  CH1E       500.00  0      180.0000 !
IMPRoper  O    C      NH1  CH1E       500.00  0      0.0000 !
!IMPRoper NC2  C      NH1  CH1E       500.00  0      180.0000 !
IMPRoper  CH1E C      NH1  NC2        500.00  0      180.0000 !
!IMPRoper  CH1E C      NH1  NC2        500.00  0      180.0000 !

! CR3-CR3 sidechain dihedrals

DIHEdral  NH1  NC2  CH2E CF      2.00      3  0.0000
DIHEdral  NH1  NC2  CH2E CH2E    2.00      3  0.0000
DIHEdral  CR1E CF  CH2E NC2      1.00      2  0.0000

! backbone psi related due to NH & CB (N.B. 2.0x the strength of above not
active with usual topology file added 03-JUL-01 modified 07-JUL-01)

DIHEdral CH2E  CH1E  C      NH1      MULT 6  0.5  1 0.0000 0.4  2 0.0000
0.3  3 0.0000 0.2  4 0.0000 0.1  5 0.0000 0.05  6 0.0000 !aaa-aaa
{ DIHEdral CH2E  NC2  C      NH1      MULT 6  0.5  1 0.0000 0.4  2
0.0000 0.3  3 0.0000 0.2  4 0.0000 0.1  5 0.0000 0.05  6 0.0000 !FV
aza}

! backbone phi (not active with usual topology file modified 03-JUL-01)

DIHEdral C      NH1  CH1E  C      MULT 6  0.375  1 0.0000 0.3  2
0.0000 0.225  3 0.0000 0.15  4 0.0000 0.075  5 0.0000 0.0375  6 0.0000
!aaa-aaa
{ DIHEdral C      NH1  NC2  C      MULT 6  0.375  1 0.0000 0.3  2
0.0000 0.225  3 0.0000 0.15  4 0.0000 0.075  5 0.0000 0.0375  6 0.0000
!FV aza}
DIHEdral NC2  CH2E  C      NH1      MULT 6  0.375  1 0.0000 0.3  2
0.0000 0.225  3 0.0000 0.15  4 0.0000 0.075  5 0.0000 0.0375  6 0.0000
!FV aza
DIHEdral NC2  CH2E  C      O      MULT 6  0.375  1 0.0000 0.3  2 0.0000
0.225  3 0.0000 0.15  4 0.0000 0.075  5 0.0000 0.0375  6 0.0000 !FV aza
DIHEdral C      NH1  NC2  CH2E      MULT 6  0.375  1 0.0000 0.3  2
0.0000 0.225  3 0.0000 0.15  4 0.0000 0.075  5 0.0000 0.0375  6 0.0000
!FV aza
```

4. Modifications des fichiers d'ARIA

Les fichiers atomnames.xml, iupac.xml, PseudoAtom.py, Nomenclature.py et AminoAcid.py ont été modifiés pour définir la nomenclature des nouveaux résidus et caractériser leurs pseudo-atomes. Voici les modifications apportées dans l'exemple du résidu aza- β^3 -lysine :

atomnames.xml

```
<residue residue_type="AMINO_ACID" iupac_name="AZK" cns_name="AZK"
dyana_name="AZK">
  <atom iupac_name="CA" cns_name="CA" dyana_name="CA"/>
```

```

<atom iupac_name="HA" cns_name="HA" dyana_name="HA"/>
<atom iupac_name="C" cns_name="C" dyana_name="C"/>
<atom iupac_name="CS" cns_name="CS" dyana_name="CS"/>
<atom iupac_name="CB" cns_name="CB" dyana_name="CB"/>
<atom iupac_name="CD" cns_name="CD" dyana_name="CD"/>
<atom iupac_name="CE" cns_name="CE" dyana_name="CE"/>
<atom iupac_name="CG" cns_name="CG" dyana_name="CG"/>
<atom iupac_name="H" cns_name="HN" dyana_name="HN"/>
<atom iupac_name="H1" cns_name="HT3" dyana_name="H1"/>
<atom iupac_name="H2" cns_name="HT2" dyana_name="H2"/>
<atom iupac_name="H3" cns_name="HT1" dyana_name="H3"/>
<atom iupac_name="HS1" cns_name="HS1" dyana_name="HS1"/>
<atom iupac_name="HS2" cns_name="HS2" dyana_name="HS2"/>
<atom iupac_name="HB2" cns_name="HB2" dyana_name="HB2"/>
<atom iupac_name="HB3" cns_name="HB1" dyana_name="HB3"/>
<atom iupac_name="HD2" cns_name="HD2" dyana_name="HD2"/>
<atom iupac_name="HD3" cns_name="HD1" dyana_name="HD3"/>
<atom iupac_name="HE2" cns_name="HE2" dyana_name="HE2"/>
<atom iupac_name="HE3" cns_name="HE1" dyana_name="HE3"/>
<atom iupac_name="HG2" cns_name="HG2" dyana_name="HG2"/>
<atom iupac_name="HG3" cns_name="HG1" dyana_name="HG3"/>
<atom iupac_name="HT" cns_name="None" dyana_name="None"/>
<atom iupac_name="HZ1" cns_name="HZ2" dyana_name="HZ1"/>
<atom iupac_name="HZ2" cns_name="HZ1" dyana_name="HZ2"/>
<atom iupac_name="HZ3" cns_name="HZ3" dyana_name="HZ3"/>
<atom iupac_name="N" cns_name="N" dyana_name="N"/>
<atom iupac_name="NS" cns_name="NS" dyana_name="NS"/>
<atom iupac_name="NT" cns_name="None" dyana_name="None"/>
<atom iupac_name="NZ" cns_name="NZ" dyana_name="NZ"/>
<atom iupac_name="O" cns_name="O" dyana_name="O"/>
<atom iupac_name="O'" cns_name="OT1" dyana_name="O"/>
<atom iupac_name="O'" cns_name="OT2" dyana_name="OXT"/>
</residue>

```

iupac.xml

```

<residue residue_type="AMINO_ACID" name="AZK">
  <atom name="CA" atom_type="C" hetero="None"/>
  <atom name="HA" atom_type="H" hetero="CA"/>
  <atom name="C" atom_type="C" hetero="None"/>
  <atom name="H" atom_type="H" hetero="N"/>
  <atom name="CS" atom_type="C" hetero="None"/>
  <atom name="HS1" atom_type="H" hetero="CS"/>
  <atom name="HS2" atom_type="H" hetero="CS"/>
  <atom name="O" atom_type="O" hetero="None"/>
  <atom name="NS" atom_type="N" hetero="None"/>
  <atom name="N" atom_type="N" hetero="None"/>
  <atom name="CB" atom_type="C" hetero="None"/>
  <atom name="O'" atom_type="O" hetero="None"/>
  <atom name="O'" atom_type="O" hetero="None"/>
  <atom name="NT" atom_type="N" hetero="None"/>
  <atom name="HT" atom_type="H" hetero="NT"/>
  <atom name="H1" atom_type="H" hetero="N"/>
  <atom name="H2" atom_type="H" hetero="N"/>
  <atom name="H3" atom_type="H" hetero="N"/>
  <atom name="CG" atom_type="C" hetero="None"/>
  <atom name="CE" atom_type="C" hetero="None"/>
  <atom name="CD" atom_type="C" hetero="None"/>
  <atom name="HD3" atom_type="H" hetero="CD"/>
  <atom name="HD2" atom_type="H" hetero="CD"/>
  <atom name="HE2" atom_type="H" hetero="CE"/>

```

```

<atom name="HE3" atom_type="H" hetero="CE"/>
<atom name="HG2" atom_type="H" hetero="CG"/>
<atom name="HG3" atom_type="H" hetero="CG"/>
<atom name="NZ" atom_type="N" hetero="None"/>
<atom name="HZ1" atom_type="H" hetero="NZ"/>
<atom name="HB3" atom_type="H" hetero="CB"/>
<atom name="HZ3" atom_type="H" hetero="NZ"/>
<atom name="HZ2" atom_type="H" hetero="NZ"/>
<atom name="HB2" atom_type="H" hetero="CB"/>
<backbone>
  <atom_name name="N"/>
  <atom_name name="HA"/>
  <atom_name name="CA"/>
  <atom_name name="H"/>
  <atom_name name="NS"/>
  <atom_name name="CS"/>
  <atom_name name="C"/>
  <atom_name name="HS1"/>
  <atom_name name="HS2"/>
<equivalent_group group_type="METHYLENE">
  <atom_name name="HS1"/>
  <atom_name name="HS2"/>
</equivalent_group>
</backbone>
<sidechain>
  <atom_name name="CB"/>
  <atom_name name="CG"/>
  <atom_name name="CE"/>
  <atom_name name="CD"/>
  <atom_name name="HD3"/>
  <atom_name name="HD2"/>
  <atom_name name="HE2"/>
  <atom_name name="HE3"/>
  <atom_name name="HG2"/>
  <atom_name name="HG3"/>
  <atom_name name="NZ"/>
  <atom_name name="HZ1"/>
  <atom_name name="HB3"/>
  <atom_name name="HZ3"/>
  <atom_name name="HZ2"/>
  <atom_name name="HB2"/>
</sidechain>
<terminus terminus_type="N_STANDARD">
  <atom_name name="H"/>
</terminus>
<terminus terminus_type="N_AMINYL">
  <atom_name name="H1"/>
  <atom_name name="H2"/>
  <atom_name name="H3"/>
</terminus>
<terminus terminus_type="C_STANDARD">
  <atom_name name="O"/>
</terminus>
<terminus terminus_type="C_AMIDO">
  <atom_name name="O'"/>
  <atom_name name="NT"/>
  <atom_name name="HT"/>
</terminus>
<terminus terminus_type="C_CARBOXYL">
  <atom_name name="O'"/>
  <atom_name name="O''"/>

```

```

</terminus>
<equivalent_group group_type="METHYL">
  <atom_name name="HZ1"/>
  <atom_name name="HZ2"/>
  <atom_name name="HZ3"/>
</equivalent_group>
<equivalent_group group_type="METHYLENE">
  <atom_name name="HB2"/>
  <atom_name name="HB3"/>
</equivalent_group>
<equivalent_group group_type="METHYLENE">
  <atom_name name="HG2"/>
  <atom_name name="HG3"/>
</equivalent_group>
<equivalent_group group_type="METHYLENE">
  <atom_name name="HD2"/>
  <atom_name name="HD3"/>
</equivalent_group>
<equivalent_group group_type="METHYLENE">
  <atom_name name="HE2"/>
  <atom_name name="HE3"/>
</equivalent_group>
<equivalent_group group_type="NTERMINUS">
  <atom_name name="H1"/>
  <atom_name name="H2"/>
  <atom_name name="H3"/>
</equivalent_group>
</residue>

```

AminoAcid.py

```

'X': ('X', 'AZK', 'azalys'),
'Z': ('Z', 'NAF', 'azanaf'),
'J': ('J', 'NAL', 'azanal'),
'AZK': ('X', 'AZK', 'azalys'),
'NAF': ('Z', 'NAF', 'azanaf'),
'NAL': ('J', 'NAL', 'azanal'),

```

PseudoAtom.py

```

'AZK': {'QB': ('HB2', 'HB3'), \
        'HB%': ('HB2', 'HB3'), \
        'HB': ('HB2', 'HB3'), \
        'QS': ('HS1', 'HS2'), \
        'HS%': ('HS1', 'HS2'), \
        'HS': ('HS1', 'HS2'), \
        'QG': ('HG2', 'HG3'), \
        'HG%': ('HG2', 'HG3'), \
        'HG': ('HG2', 'HG3'), \
        'QD': ('HD2', 'HD3'), \
        'HD%': ('HD2', 'HD3'), \
        'HD': ('HD2', 'HD3'), \
        'QE': ('HE2', 'HE3'), \
        'HE%': ('HE2', 'HE3'), \
        'HE': ('HE2', 'HE3'), \
        'QZ': ('HZ1', 'HZ2', 'HZ3'), \
        'HZ%': ('HZ1', 'HZ2', 'HZ3'), \

```

Nomenclature.py

```

...
#II. methylenes
#1. GLY HA:
if threeLetter == 'GLY' and atomName == 'HA1':

```

```

        atomName = 'HA2'
    elif threeLetter == 'GLY' and atomName == 'HA2':
        atomName = 'HA1'

    #2. ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, HIS, LEU, LYS, AZK, NAF, NAL, MET,
    PHE, PRO, SER, TRP, TYR HB%:
        elif threeLetter in ('ARG', 'ASN', 'ASP', 'CYS', 'GLN', 'GLU', 'HIS',
        'LEU', 'LYS', \
                                'MET', 'PHE', 'PRO', 'SER', 'TRP', 'TYR', 'AZK',
        'NAF', 'NAL') and \
                                atomName == 'HB3':
            atomName = 'HB1'
        elif threeLetter in ('ARG', 'ASN', 'ASP', 'CYS', 'GLN', 'GLU', 'HIS',
        'LEU', 'LYS', \
                                'MET', 'PHE', 'PRO', 'SER', 'TRP', 'TYR', 'AZK',
        'NAF', 'NAL') and \
                                atomName == 'HB1':
            atomName = 'HB3'

    #3. ARG, GLN, GLU, LYS, MET, PRO HG%:
        elif threeLetter in ('ARG', 'GLN', 'GLU', 'LYS', 'AZK', 'MET', 'PRO')
and\
            atomName == 'HG1':
                atomName = 'HG3'
        elif threeLetter in ('ARG', 'GLN', 'GLU', 'LYS', 'AZK', 'MET', 'PRO')
and\
            atomName == 'HG3':
                atomName = 'HG1'

    #4. ILE HG1%:
        elif threeLetter == 'ILE' and atomName == 'HG13':
            atomName = 'HG11'
        elif threeLetter == 'ILE' and atomName == 'HG11':
            atomName = 'HG13'

    #5. ARG, ASN, LYS, PRO HD:
        elif threeLetter in ('ARG', 'ASN', 'LYS', 'AZK', 'PRO') and atomName ==
        'HD1':
            atomName = 'HD3'
        elif threeLetter in ('ARG', 'ASN', 'LYS', 'AZK', 'PRO') and atomName ==
        'HD3':
            atomName = 'HD1'

    #6. LYS, AZK HE:
        elif threeLetter in ('AZK', 'LYS') and atomName == 'HE3':
            atomName = 'HE1'
        elif threeLetter == ('AZK', 'LYS') and atomName == 'HE1':
            atomName = 'HE3'
...

```

5. Calcul d'ARIA dans le cas d'un peptide cyclique

Lors du calcul du « NafNaf » qui est un peptide cyclique, des modifications additionnelles doivent être effectuées pour définir la liaison entre le dernier et le premier résidu et prendre en compte les contraintes importantes que subissent les angles à cause de la cyclisation.

Pour cycliser le peptide dans CNS, il est nécessaire d'ajouter une liaison peptidique PEPZ entre les résidus 6 et 1 comme dans le cas de l' α^3K que l'on a vu précédemment. Malgré tout le calcul ne fonctionnera pas dans l'espace des angles de torsion mais uniquement dans

l'espace des coordonnées cartésiennes. Ce calcul est plus gourmand en temps machine, nous avons donc modifié le fichier `torsiontop.cns` pour « casser » une liaison avec la ligne suivante :

```
...  
free bond ( resid 6 and name C and segid " A" ) ( resid 1 and name N  
and segid " A" )  
...
```

Ceci nous permet de faire nos calculs dans l'espace des angles de torsion, avec comme unique variable, les angles de torsion. Ensuite afin d'éviter les instabilités à cause de la contrainte de cyclisation, la valeur du paramètre *timestep* et les températures élevées du protocole de recuit simulé ont été divisées par deux.

ANNEXE IV

La modélisation par homologie avec le logiciel MODELLER

L'élucidation des structures tridimensionnelles de protéines par radiocristallographie ou par RMN est souvent compliquée par les difficultés d'obtention de quantités suffisantes de protéines pures et de cristaux diffractants ou par des problèmes de stabilité de la protéine en solution. Les structures tridimensionnelles connues, déposées dans la Protein Data Bank (PDB), peuvent cependant être utilisées pour concevoir des modèles pour des membres de familles apparentées en utilisant la modélisation comparative ou par « homologie » des protéines. Devant le degré important de similarité des structures des répétitions des protéines de la famille des spectrines de différentes espèces, cette technique a été utilisée pour construire des modèles de la répétition 23 de la dystrophine humaine et des mutants de cette répétition induisant des dystrophies musculaire de Duchesne (DMD). L'objectif est de proposer une hypothèse à la perte de stabilité observée dans le cas des répétitions mutées par de simples ou une double substitution des résidus 2910 et 2912 (E2910V et N2912D).

L'utilisation de la modélisation par homologie s'est imposée devant la difficulté de produire ces répétitions avec des rendements importants et la dégénérescence importante des signaux RMN sur les spectres 3D ^{15}N - ^{13}C HSQC-TOCSY malgré des spectres 2D ^{15}N -HSQC acceptables. Ces travaux sont exposés dans la publication suivante.

Legardinier S*, **Legrand B***, Raguénès-Nicol C, Bondon A, Hardy S, Tascon C, Le Rumeur E, Hubert JF. A two-amino-acid mutation encountered in a Duchenne muscular dystrophy decreases stability of the R23 spectrin-like repeat of dystrophin. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284:8822-32.

De nombreuses répétitions du domaine central de la dystrophine ont été produites, leur stabilité et interactions ont été caractérisées dans l'équipe. Certaines sont actuellement soumises à des tests de cristallisation malgré la difficulté d'obtenir des cristaux pour des protéines filamenteuses de ce type. En attendant le retour de ces tests, l'idée actuelle est de monter un protocole afin de faire des analyses statistiques de toutes ces répétitions à partir de modèles. Cela implique l'utilisation d'une méthode de modélisation comparative automatique (et non manuelle comme avec le logiciel MODELLER utilisé jusqu'ici) et l'utilisation de logiciels permettant de calculer et analyser les surfaces électrostatiques et hydrophobes de séries de protéines. Ces travaux sont en cours avec Elisabeth Le Rumeur.

Bibliographie annexes

1. Cavanagh, J., J., F., Palmer, A. G., 3rd, Rance, M., and N.J., S. (1996) Protein NMR spectroscopy - principles and Practice, *edition academic press inc.*
2. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-921.
3. Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W., and Nilges, M. (2003) ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation, *Bioinformatics* 19, 315-316.
4. Salaun, A., Potel, M., Roisnel, T., Gall, P., and Le Grel, P. (2005) Crystal structures of aza-beta3-peptides, a new class of foldamers relying on a framework of hydrazinoturns, *J Org Chem* 70, 6499-6502.
5. Le Grel, P., Salaun, A., Potel, M., Le Grel, B., and Lassagne, F. (2006) Aza-beta3-cyclohexapeptides: pseudopeptidic macrocycles with interesting conformational and configurational properties slow pyramidal nitrogen inversion in 24-membered rings!, *J Org Chem* 71, 5638-5645.

RÉSUMÉ

Ce mémoire de thèse est divisé en deux chapitres, le premier aborde l'impact des osmolytes sur la dihydrofolate réductase (DHFR) et le second a pour objet l'étude structurale de pseudopeptides antimicrobiens en présence de modèles membranaires.

Les osmolytes organiques sont de petites molécules accumulées dans les cellules et les tissus de nombreux organismes lors d'une contrainte hyperosmotique pour maintenir le volume cellulaire. Ces solutés ont également un rôle essentiel dans la sauvegarde de l'intégrité cellulaire et dans la stabilisation des macromolécules contre l'effet de divers stress environnementaux. Les osmolytes peuvent néanmoins induire une inhibition significative des enzymes et les bases moléculaires de leurs effets sur les propriétés des protéines sont au centre de nombreuses études. Nous avons étudié la DHFR, une enzyme clé du métabolisme, en présence de divers solutés. Après avoir vérifié que les osmolytes ne modifiaient pas la structure globale de la DHFR, nous avons montré qu'ils étaient capables de stabiliser la structure et d'inhiber l'activité de cette enzyme. L'inhibition de la DHFR est liée à la diminution de la vitesse de sortie (k_{off}) du produit, que nous avons mesurée en présence d'osmolytes. L'étude de la dynamique interne de la DHFR, sur plusieurs échelles de temps apporte des réponses sur l'origine de l'inhibition de la DHFR en présence d'osmolytes.

La seconde partie présente nos travaux sur la relation structure-activité de plusieurs peptides antimicrobiens. Ce projet s'inscrit dans la course au développement de nouvelles molécules actives pour palier la résistance croissante des pathogènes contre les antibiotiques conventionnels. Nous avons déterminé les structures et étudié le comportement de différents peptides et pseudopeptides en environnement membranaire modèle, micelles de SDS et phospholipides afin de proposer un mode d'action pour chacun d'eux.

Mots clés : DHFR, RMN, enzymes, osmolytes, solutés, stress osmotique, activité, stabilité, dynamique, bactéries, peptides antimicrobiens, pseudopeptides, structures, membranes.

ABSTRACT

This manuscript is divided in two chapters; the first one deals with the osmolytes effect on the DHFR enzyme (dihydrofolate reductase) and the second one presents a structural study of antimicrobial pseudopeptides in model membranes.

The osmolytes are small molecules accumulated by cells and tissues of a wide variety of organisms in response to hyperosmotic stress, in order to maintain the cellular volume. They contribute to saving the cellular integrity and to stabilizing the macromolecules from various environmental stresses. Nevertheless, enzyme activity is sometimes inhibited by these cosolutes and the molecular basis of their effects on the proteins properties is of great interest. We studied the DHFR, which is a key enzyme in the metabolism, in presence of osmolytes. We demonstrate that its overall structure is maintained, while the osmolytes stabilize the DHFR structure, they inhibit its activity at the same time. The dissociation rate constant, k_{off} , of substrate analogues decreases with increasing the osmolyte concentrations and reflects the variation of DHFR catalytic rate. The study of the DHFR dynamic on several timescales gives answer on the origin of the DHFR inhibition in presence of osmolytes.

The second chapter concerns the study of the structure-activity relationship for several antimicrobial peptides. The main objective of this project is to develop new drugs to face the increasing antibiotic resistance of pathogens against conventional antibiotics. We solved NMR solution structure and studied the behavior of peptides and pseudopeptides in various model membranes, SDS micelles and phospholipids, in order to propose a mechanism of action for each of them.

Key words: DHFR, NMR, enzymes, osmolytes, cosolutes, osmotic stress, activity, stability, dynamic, bacteria, antimicrobials peptides, pseudopeptides, structures, membranes.